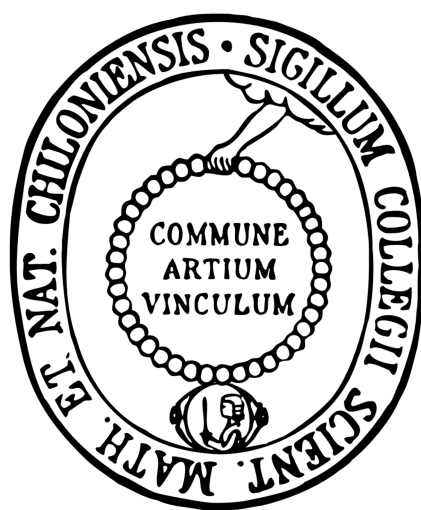


**SYNTHESE, CHARAKTERISIERUNG UND METABOLISMUS
VON N,N' -DIHYDROXYBENZAMIDINEN
UND N -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIMEN**



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

LAURA SCHWARZ

Kiel 2015

Referent:	Prof. Dr. Bernd Clement
Korreferent:	Prof. Dr. Christian Peifer
Tag der mündlichen Prüfung:	25.02.2015
Zum Druck genehmigt:	25.02.2015
	Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl (Dekan)

Meiner Familie

VORBEMERKUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd Clement an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie, im Zeitraum April 2011 bis Dezember 2014 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen bereits veröffentlicht:

Fachzeitschriften:

1. Schwarz, L.; Girreser, G.; Clement, B.
„Synthesis and Characterization of *para*-Substituted *N,N'*-Dihydroxybenzamidines and Their Derivatives as Model Compounds for a Class of Prodrugs.”
European Journal of Organic Chemistry **2014**, 9, 1961–1975.
2. Schwarz, L.; Girreser, G.; Clement, B.
„Synthesis of *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidine using a TBDMS protecting group protocol.”
Tetrahedron Letters **2014**, 55, 3322–3324.

Posterbeiträge:

1. Schwarz, L.; Girreser, G.; Clement, B.
„Synthesis and Characterization of *para*-Substituted Dihydroxybenzamidines and *O*-Substituted Derivatives.”
DPHG Jahrestagung **2013**, Freiburg, Deutschland.
2. Schwarz, L.; Girreser, G.; Clement, B.
„Synthesis, Characterization and Metabolism of *para*-Substituted *N,N'*-Dihydroxybenzamidines and *O,O'*-Disubstituted Derivatives.”
23rd International Symposium on Medicinal Chemistry, EFMC-ISMC **2014**, Lissabon, Portugal.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Amidine und Guanidine	1
1.1.1	Vorkommen	1
1.1.2	Eigenschaften	1
1.2	Amidine in Arzneistoffen	2
1.2.1	Blutgerinnungshemmer	2
1.2.2	Antiparasitika	2
1.2.3	Antihypertonika	3
1.2.4	Hemmstoffe der NO-Synthase (NOS)	3
1.2.5	Chemotherapeutika	3
1.3	Prodrugs	4
1.3.1	Allgemeines	4
1.3.2	Arzneistoffmetabolismus	5
1.3.3	Verbesserung der Bioverfügbarkeit	7
1.3.4	Prodrug-Prinzipien für Amidine	8
1.3.4.1	Carbamate und Acylamidine	8
1.3.4.2	Amidoxime	9
1.3.4.3	Substituierte Amidoxime	11
1.3.4.4	Dihydroxyamidine	11
1.4	Bisherige Synthesen von <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen	13
1.5	Biotransformation <i>N</i>-hydroxylierter Amidine	15
2	ZIELSETZUNG	17
2.1	Entwicklung einer allgemeinen Synthesestrategie für <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidine	17
2.1.1	Synthese von unterschiedlichen Modellsubstanzen	17
2.1.2	Charakterisierung des Effektes des <i>para</i> -Substituenten auf die Dihydroxyamidin-Struktur	18
2.1.3	Charakterisierung von <i>O</i> -substituierten <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidinen	18
2.2	Untersuchung der Bioaktivierung von <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen	19

2.3	Untersuchung des Einflusses der <i>N</i>-Substitution auf die Bioaktivierung von Benzamidoximen	19
3	SYNTHESEN	21
3.1	Synthese von <i>para</i>-substituierten <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen	21
3.1.1	Einleitung	21
3.1.2	Synthesestrategien	21
3.1.3	<i>para</i> -Substituierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	23
3.1.4	Physikochemische Eigenschaften	29
3.1.4.1	Stabilitätsuntersuchungen	29
3.1.4.2	Bestimmung der Löslichkeit	29
3.1.4.3	Berechnung der pK_a -Werte	30
3.1.4.4	Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte	33
3.1.5	Zusammenfassung und Ausblick	35
3.2	Synthese von <i>O</i>-substituierten <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen	36
3.2.1	Einleitung	36
3.2.2	Synthesestrategien	37
3.2.3	<i>O</i> -Substituierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	39
3.2.3.1	<i>O</i> -Methylierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	39
3.2.3.2	<i>O</i> -Benzylierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	41
3.2.3.3	<i>O</i> -Tetrahydropyranylsubstituierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	45
3.2.3.4	<i>O-tert</i> -Butyldimethylsilylierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	48
3.2.3.5	<i>O-tert</i> -Butyldiphenylsilylierte <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	49
3.2.3.6	Weitere Versuche der <i>O</i> -Substitution von <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidinen	51
3.2.4	Physikochemische Eigenschaften	58
3.2.4.1	Stabilitätsuntersuchungen	58
3.2.4.2	Bestimmung der Löslichkeit	64
3.2.4.3	Berechnung der pK_a -Werte	66
3.2.4.4	Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte	66
3.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	66
3.3	Synthese cyclischer <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidine	67
3.3.1	Einleitung	67
3.3.2	Synthesestrategien	68
3.3.3	Cyclische <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidine	69
3.3.4	Physikochemische Eigenschaften	70
3.3.4.1	Stabilitätsuntersuchungen	70
3.3.4.2	Bestimmung der Löslichkeit	70
3.3.4.3	Berechnung der pK_a -Werte	71

3.3.4.4	Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte	71
3.3.5	Zusammenfassung und Ausblick	71
3.4	Synthese <i>O</i>-substituierter Benzamidoxime	71
3.4.1	Einleitung	71
3.4.2	Synthesestrategie	72
3.4.3	<i>O</i> -Substituierte Benzamidoxime	73
3.4.4	Zusammenfassung und Ausblick	73
3.5	Synthese <i>N</i>-substituierter Benzamidoxime	74
3.5.1	Einleitung	74
3.5.2	Synthesestrategie	74
3.5.3	<i>N</i> -Substituierte Benzamidoxime	75
3.5.4	Zusammenfassung und Ausblick	76
3.6	Synthese von Bis(<i>N,N'</i>-dihydroxy)furamidin	76
3.6.1	Einleitung	76
3.6.2	Synthesestrategie	76
3.6.3	2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan-bis- <i>N,N'</i> -dihydroxyamidin	76
3.6.4	Zusammenfassung und Ausblick	78
3.7	Synthese von heterocyclischen Pentamidin-Analoga	79
3.7.1	Einleitung	79
3.7.2	Synthesestrategien	79
3.7.3	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-(3-carboxypropinyloxy)-amidinopyridin	81
3.7.4	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'- <i>N,N'</i> -dihydroxyamidinopyridin	81
3.7.5	Zusammenfassung	83
3.8	Synthese von Bis(<i>N,N'</i>-dihydroxy)diminazen	84
3.8.1	Einleitung	84
3.8.2	Synthesestrategie	84
3.8.3	Bis(<i>N,N'</i> -dihydroxy)diminazen	85
3.8.4	Zusammenfassung und Ausblick	89
3.9	Zusammenfassung	89
4	Spektroskopische Untersuchungen	91

4.1	Einleitung	91
4.2	^{15}N-NMR-Spektroskopie von <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidin	91

4.3	Spektroskopische Charakterisierung tautomerer <i>O</i>-monosubstituierter <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidine am Beispiel von <i>p</i>-Methoxy-<i>O</i>-benzyl-<i>N,N'</i>-dihydroxybenzamidin	93
4.4	Spektroskopische Charakterisierung von <i>O</i>-disubstituierten <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen am Beispiel von <i>O,O'</i>-Dimethyl-<i>N,N'</i>-dihydroxybenzamidin	97
4.5	Strukturaufklärung cyclischer <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidine	101
4.6	Identifikation des Dimers	105
4.7	²⁹Si-NMR-spektroskopische Untersuchungen	108
4.8	Korrelationen mit Hammett σ-Werten	111
4.8.1	Einleitung	111
4.8.2	¹ H-NMR-Korrelationen	111
4.8.3	¹³ C-NMR-Korrelationen	114
4.8.4	¹⁵ N-NMR-Korrelationen	117
4.8.5	²⁹ Si-NMR-Korrelationen	119
4.8.6	Berechnung der Hammett-Konstanten σ der unterschiedlichen Dihydroxyamidin-Funktionen	120
4.8.7	Zusammenfassung	123
5	BIOAKTIVIERUNGSUNTERSUCHUNGEN	124
5.1	Einleitung	124
5.1.1	Das Cytochrom P450-Enzymsystem	124
5.1.2	Das <i>N</i> -reduktive mARC-Enzymsystem	125
5.2	<i>In vitro</i>-Untersuchung der Bioaktivierung von ausgewählten <i>O</i>-substituierten <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidinen	126
5.2.1	Einleitung	126
5.2.2	Zielsetzung	126
5.2.3	Ergebnisse und Diskussion	127
5.2.3.1	Bioaktivierung von <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin	128
5.2.3.2	Bioaktivierung von <i>O,O'</i> -Dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	132
5.2.3.3	Bioaktivierung von 5,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol	141
5.2.4	Zusammenfassung	144
5.3	<i>In vivo</i>-Untersuchungen der Bioaktivierung von <i>O,O'</i>-Dimethyl-<i>N,N'</i>-dihydroxybenzamidin in Ratten	144
5.3.1	Einleitung	144

5.3.2	Zielsetzung	145
5.3.3	Studiendesign	145
5.3.4	Ergebnisse und Diskussion	145
5.3.5	Plasmaproteinbindung	151
5.3.5.1	Einleitung	151
5.3.5.2	Zielsetzung	152
5.3.5.3	Ergebnisse und Diskussion	152
5.3.6	Zusammenfassung	159
5.4	<i>In vitro</i>-Untersuchung der Bioaktivierung von <i>N</i>-substituierten Benzamidoximen	160
5.4.1	Einleitung	160
5.4.2	Zielsetzung	160
5.4.3	Ergebnisse und Diskussion	161
5.4.3.1	Inkubationen mit der äußeren Mitochondrienmembran von Schweinen (SLOMV)	162
5.4.3.2	Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC1-Enzymsystem (rhARC1)	165
5.4.3.3	Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC2-Enzymsystem (rhARC2)	166
5.4.3.4	Korrelationen der Umsetzungen mit dem pK_a -Wert und NMR-Daten	168
5.4.4	Zusammenfassung	170
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	172
7	EXPERIMENTELLER TEIL	176
7.1	Synthesen	176
7.1.1	Geräte und Materialien	176
7.1.2	Synthesevorschriften	178
7.1.2.1	Synthese von <i>para</i> -substituierten Benzaldehyden	178
7.1.2.2	Synthese von <i>para</i> -substituierten Benzaldoximen	180
7.1.2.3	<i>N</i> - <i>tert</i> -Butyl- <i>N</i> -chlorcyanamid	184
7.1.2.4	Synthese von <i>para</i> -substituierten Benzhydroxamsäurechloriden	185
7.1.2.5	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidinen	188
7.1.2.6	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O</i> -Methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	193
7.1.2.7	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O,O'</i> -Dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	198
7.1.2.8	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O</i> -Benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	201
7.1.2.9	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O,O'</i> -Dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	209
7.1.2.10	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O</i> -Tetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	215

7.1.2.11	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O</i> - <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	223
7.1.2.12	Synthese von <i>p</i> -Amino- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	227
7.1.2.13	Synthese von <i>para</i> -substituierten <i>O,O'</i> -Di- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidinen	228
7.1.2.14	Synthese von cyclischen <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidinen	231
7.1.2.15	Synthese von <i>O</i> -substituierten Benzamidoximen	233
7.1.2.16	Synthese von <i>N</i> -substituierten Benzamidoximen	234
7.1.2.17	Synthese von 2,5-disubstituierten Furanen	236
7.1.2.18	Synthese von heterocyclischen Pentamidinanaloge	237
7.1.2.19	Synthese von Diminazen-Derivaten	239
7.2	Stabilität	241
7.2.1	Geräte und Materialien	241
7.2.2	Vorbereitung der Proben	241
7.2.3	HPLC-Analytik zur Trennung möglicher Zersetzungsprodukte der Dihydroxybenzamidine	242
7.3	Löslichkeit	243
7.3.1	Geräte und Materialien	243
7.3.2	Kalibrierung	243
7.3.3	Vorbereitung der Proben	243
7.3.4	HPLC-Analytik zur Bestimmung pH-abhängiger Sättigungslöslichkeiten	244
7.4	Lipophilie	244
7.4.1	Geräte und Materialien	244
7.4.2	HPLC-Analytik zur Bestimmung von log <i>D</i> -Werten	244
7.5	Bioaktivierungsuntersuchungen	245
7.5.1	Geräte und Materialien	245
7.5.2	Inkubationen mit Cytochrom P450-Enzymquellen	245
7.5.2.1	Enzymquellen	245
7.5.2.2	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts	246
7.5.2.3	Kalibrierung und Wiederfindung	246
7.5.2.4	Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze	247
7.5.2.5	Inkubationsbedingungen	247
7.5.3	Inkubationen mit der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente mARC	247
7.5.3.1	Enzymquellen	247
7.5.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung	248
7.5.3.3	Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze	249
7.5.3.4	Inkubationsbedingungen	249

7.5.4	Inkubationen mit Mikrosomen und Mitochondrien	249
7.5.4.1	Enzymquellen	249
7.5.4.2	Kalibrierung und Wiederfindung	249
7.5.4.3	Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze	250
7.5.4.4	Inkubationsbedingungen	250
7.5.5	<i>In vivo</i> -Untersuchungen der Bioaktivierung von <i>O,O'</i> -Dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin in Ratten	250
7.5.5.1	Vorbereitung	250
7.5.5.2	Applikation der Proben	251
7.5.5.3	Blutentnahme	251
7.5.5.4	Probenaufarbeitung	251
7.5.5.5	Kalibrierung und Wiederfindung	251
7.5.5.6	Plasmaproteinbindung	252
7.5.6	HPLC-Analytik zur Trennung von Dihydroxybenzamidinen, Benzamidoximen und Benzamidin	252
7.5.7	HPLC-Analytik zur Trennung <i>N</i> -substituierter Benzamidoxime von <i>N</i> -substituierten Benzamidinen	253
7.5.7.1	Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin	253
7.5.7.2	Trennung von <i>N</i> -Methylbenzamidoxim und <i>N</i> -Methylbenzamidin	253
7.5.7.3	Trennung von <i>N</i> -Phenylbenzamidoxim und <i>N</i> -Phenylbenzamidin	254
7.5.7.4	Trennung von <i>N,N'</i> -Dimethylbenzamidoxim und <i>N,N'</i> -Dimethylbenzamidin	254
7.5.7.5	Trennung von 2-(1-Piperidyl)benzaldoxim und 1-Benzimidoylpiperidin	254
7.5.7.6	Trennung von <i>N,N'</i> -Methylphenylbenzamidoxim und <i>N,N'</i> -Methylphenylbenzamidin	254

8 LITERATURVERZEICHNIS 255

9 ANHANG I

Abkürzungsverzeichnis	i
Strukturformelverzeichnis	iv
Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung	xv
Lebenslauf	xvii
Kurzfassung	xix
Abstract	xxi

1 EINLEITUNG

1.1 Amidine und Guanidine

1.1.1 Vorkommen

Die Guanidinstruktur ist ein Bestandteil vieler natürlich vorkommender Verbindungen. So ist sie die wesentliche strukturelle Komponente der semiessenziellen Aminosäure L-Arginin, welcher vielfältige Funktionen im Organismus zukommen. Aus L-Arginin werden endogen unter anderem Harnstoff, Polyamine, Proline, Glutamat und Kreatin gebildet, wodurch sich die Bedeutung im Aminosäurestoffwechsel, in der Stabilisierung der DNA, in der Muskel-, Hirn- und Nervenfunktion, der Entgiftung von Ammoniak und der ATP-Bildung ableitet.¹ Eine besondere Wichtigkeit besitzt der als NO aus L-Arginin gebildete und physiologisch gefäßerweiternde, also blutdrucksenkende und protektiv wirkende *Endothelium-derived relaxing Factor* (EDRF).²

1.1.2 Eigenschaften

Guanidine sind stark basische Verbindungen und liegen bei physiologischem pH-Wert von 7.4 positiv geladen vor. Durch Verteilung der positiven Ladung auf die drei Stickstoffatome durch Mesomerie ist das Kation sehr stabil, was den hohen pK_a -Wert von über 13 erklärt (siehe Abbildung 1-1, A).³

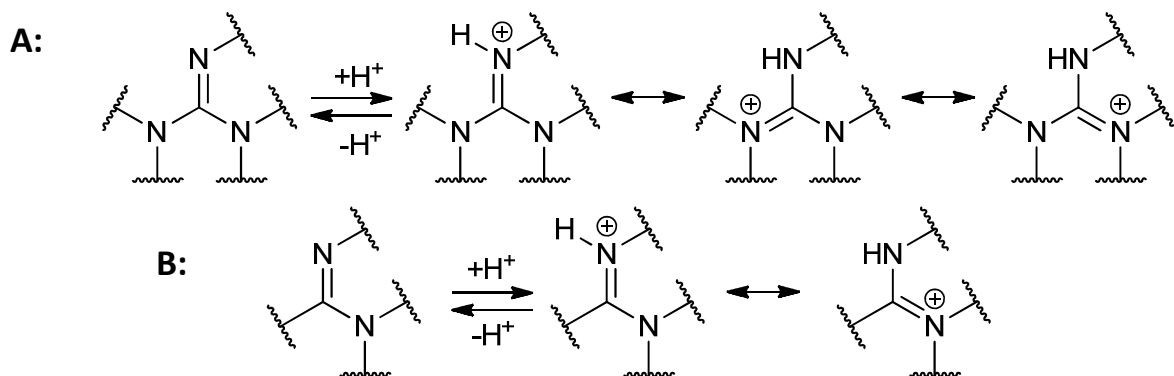


Abbildung 1-1 Mesomere Grenzformeln von Guanidinen und Amidinen nach Protonierung. A: Guanidine können die positive Ladung auf drei Stickstoffatome verteilen. B: Für Amidine sind zwei mesomere Grenzformeln nach Protonierung formulierbar.

Amidine besitzen eine um ein Stickstoffatom verminderte funktionelle Gruppe mit weiterhin sehr basischen Eigenschaften. Durch die zwei formulierbaren mesomeren Grenzformeln der protonierten AmidinGruppe liegt der pK_a -Wert bei ca. 11 (siehe Abbildung 1-1, B).⁴

Aufgrund der positiven Ladung von Guanidinen und Amidinen unter physiologischen Bedingungen können Verbindungen, welche eine entsprechende funktionelle Gruppe enthalten, nicht passiv durch Biomembranen diffundieren und somit nach oraler Gabe nicht absorbiert werden, wenn keine spezifischen Transporter zur Verfügung stehen.

Guanidine und Amidine können wegen ihrer positiven Ladung allerdings starke Wechselwirkungen zu anionischen funktionellen Gruppen, wie etwa der Carboxylgruppe eines Aspartats in aktiven Zentren von Enzymen, ausbilden. Diese ionischen Beziehungen gehören mit einer Bindungsstärke von ca. 250 kJ/mol, welche vergleichbar mit kovalenten Bindungen von 200-400 kJ/mol ist, zu den stärksten intermolekularen Wechselwirkungen und sind somit essenziell für die Wirkung an der entsprechenden Zielstruktur.⁵ Durch Imitation der physiologischen Aminosäure Arginin können einige Wirkstoffmoleküle in Interaktion mit Zielproteinen treten und dort einen Effekt hervorrufen. Ein Austausch dieser funktionellen Gruppe zugunsten der oralen Bioverfügbarkeit geht häufig mit einem starken Affinitätsverlust der betreffenden Verbindung einher.⁶

1.2 Amidine in Arzneistoffen

1.2.1 Blutgerinnungshemmer

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind derzeit die häufigste Todesursache weltweit mit steigender Tendenz. Plötzliche Gefäßverschlüsse führen zu Herzinfarkten und Schlaganfällen. Aufgrund dessen gewinnen gerinnungshemmende Wirkstoffe zunehmend an Bedeutung.⁷ In blutgerinnungshemmenden Arzneistoffen kommen unter anderem Amidine zur Anwendung. Durch die unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Amidinreste können die Arzneistoffmoleküle mit dem Carboxylat-Anion des Aspartats 189 (Asp189) des aktiven Zentrums der S1-Bindetasche von Thrombin, Faktor VIIA und Faktor XA in Wechselwirkung treten und die Gerinnungsfaktoren auf diese Weise inhibieren.⁸ Physiologische Bedeutung besitzt die Bindetasche für das Gerinnung hervorrufende Guanidinium-Ion der Aminosäure Arginin der natürlichen Substrate.⁹ Ein bedeutender Vertreter dieser Blutgerinnungshemmer in Form eines Prodrugs ist das Dabigatranetexilat (Pradaxa® 4, siehe Abbildung 1-6), weitere Prodrugs amidinhaltiger Vertreter befinden sich in der präklinischen und klinischen Entwicklung.¹⁰

Die gerinnungshemmenden Eigenschaften anderer Arzneistoffe werden außerdem durch Bindung eines Wirkstoffmoleküls an das Glycoprotein IIB/IIIA (GPIIB/IIIA), einem Oberflächenrezeptor von Thrombozyten, erreicht. Entsprechende Wirkstoffmoleküle imitieren die Arginin-Glycin-Aspartat-Aminosäuresequenz (RGA) als fibrinogenbindendes Pharmakophor. Die Bindung von Fibrinogen ruft eine Aggregation von Blutplättchen hervor, was durch Anlagerung eines Wirkstoffmoleküls mit basischer Funktion im bestimmten Abstand zu einer Carboxylgruppe bei Verdrängung des körpereigenen Substrats verhindert werden kann.⁹ Vertreter ist etwa Eptifibatid (Integrilin®) als peptidisches Arzneimittel, welches parenteral appliziert werden muss. Niedermolekulare amidinhaltige Inhibitoren sind ebenfalls Thema der Forschung.^{11,12}

1.2.2 Antiparasitika

Weiterhin werden einige Diamidine als Antiparasitika gegen Malaria, *Pneumocystis jiroveci* Pneumonie, *Trypanosoma brucei gambiense* und *rhodesiense* (Afrikanische Schlafkrankheit) sowie gegen Leishmaniose eingesetzt.¹³ Besonders problematisch an diesen durch Insektenstiche von Protozoen ausgelösten Infektionskrankheiten ist die alarmierende Entwicklung von arzneistoffresistenten Erregern. Dies macht die Notwendigkeit der Bereitstellung immer wieder neuer für eine erfolgreiche Behandlung erforderlicher Wirkstoffe aus.¹⁴ Allerdings sind diese infektiösen Krankheiten besonders in den ärmsten Regionen der Erde verbreitet, in denen keine finanziellen Mittel zur Arzneistoffentwicklung zur Verfügung gestellt werden können.¹⁵ Es ist von

vielen aromatischen Diamidinen eine antiparasitäre Wirkung bekannt, jedoch wird von denen nur Pentamidin (Pentacarinat®, **1**) verbreitet beim Menschen gegen *Trypanosoma*-Arten, *Pneumocystis jiroveci* und *Leishmania*-Arten angewendet (siehe Abbildung 1-2).¹⁶ Es zeigte sich zwar auch eine Aktivität gegen Malaria, jedoch findet Pentamidin **1** für diese Indikation in der Praxis keine Anwendung.¹⁷ In späten Stadien der Afrikanischen Schlafkrankheit wird außerdem Melarsoprol (Mel B®, Arsobal®) als arsenhaltiger Vertreter mit Guanidingruppen verabreicht. Bei Tieren findet darüber hinaus das Diamidin Diminazen Anwendung.¹³ Alle genannten Verbindungen müssen parenteral verabreicht werden und verursachen schwere Nebenwirkungen wie Hypotension, Kardiotoxizität, Enzephalopathien und Nephrotoxizität.¹⁸

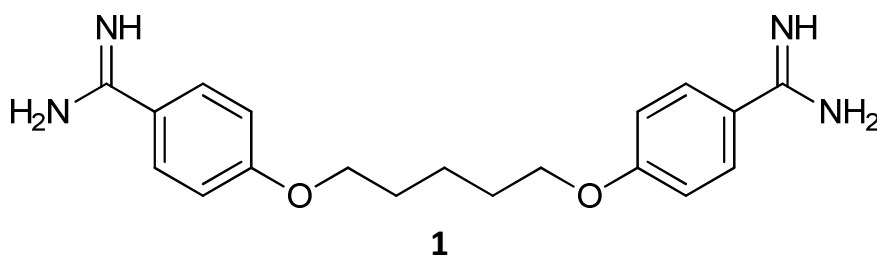


Abbildung 1-2 Der Arzneistoff Pentamidin (Pentacarinat®, **1**) ist ein aromatisches Diamidin und wird gegen die Afrikanische Schlafkrankheit eingesetzt.

1.2.3 Antihypertonika

Einige bedeutsame Antihypertonika besitzen Guanidin- oder Amidin-Funktionen in ihren Molekülen. So enthalten Clonidin (Catapresan®) und sein Analogon Moxonidin (Cynt®) als Imidazolderivate wirksamkeitsbestimmende cyclische Guanidinstrukturen.¹⁹ Diamidine zeigen ebenfalls eine im Falle von Pentamidin **1** auch als Nebenwirkung bei der Behandlung der *Trypanosomiasis* auftretende antihypertonische Wirksamkeit.^{20,21} Der Wirkungsmechanismus konnte allerdings noch nicht vollständig geklärt werden. Theorien postulieren eine erhöhte Histaminfreisetzung und einen direkten muskulotropen Angriff als Ursache für die Blutdrucksenkung durch Diamidine.^{21,22}

1.2.4 Hemmstoffe der NO-Synthase (NOS)

Die vasodilatierende Wirkung von endogenem NO führt in erster Linie zu einer Senkung des Blutdrucks und zur Protektion der Gefäße. In pathologischen Zuständen wie Migräne oder neurodegenerative Erkrankungen kann das körpereigene NO aber auch überreguliert sein. Die Hemmung der NO-Synthase (NOS) stellt ein geeignetes Target zur Bekämpfung dieser Krankheiten dar.²³ Entsprechende Wirkstoffe besitzen unter anderem eine basische Amidinfunktion zur Imitation des physiologischen Substrats L-Arginin. Wesentlich dabei ist die Selektivität der NOS-Inhibitoren für die neuronale NOS (nNOS) gegenüber der gefäßerweiternden protektiven endothelialen NOS (eNOS). Die sich derzeit in der präklinischen Entwicklung befindlichen amidinhaltigen Verbindungen erwiesen sich als wirksam und selektiv für die nNOS-Hemmung und stellen neben den 5-HT_{1B/1D/1F}-rezeptorstimulierenden Triptanen potenzielle Wirkstoffe gegen Migräne dar.^{24,25}

1.2.5 Chemotherapeutika

Viele selektive Matriptase-Inhibitoren enthalten für die Wirkung essenzielle Amidin-Funktionen. Die Matriptase als membranständige trypsinartige Serinprotease ist an Um- und Abbauprozessen durch

multiple proteolytische Reaktionen, an der Wachstumsregulation, der Beweglichkeit und dem Überleben von Zellen beteiligt. Da diese Prozesse verstärkt in tumoralen Geweben auftreten, wird das Enzym mit der Entstehung und Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht.^{26,27} Außerdem wurde kürzlich entdeckt, dass auch die Aktivierung des Hämagglutinins von Viren wie den H9N2- und H1N1-Influenza-A-Viren – und damit die virale Replikation – durch Matriptase katalysiert wird.^{28,29} Folglich stellt die Matriptase ein geeignetes Zielmolekül für Arzneistoffe verschiedener Indikationen dar. Wichtig für die Hemmung der Matriptase ist die Anlagerung in der S1-Bindetasche. Diese enthält die Carboxylgruppe des Asp189 und bindet deswegen bevorzugt durch eine besonders starke Ionenbeziehung ein amidinhaltiges Molekül. Zahlreiche Amidin-Substrate konnten in Testungen bereits eine selektive Hemmung der Matriptase belegen.^{27,30}

1.3 Prodrugs

1.3.1 Allgemeines

Nahezu jeder Arzneistoff besitzt unerwünschte physikochemische oder biologische Eigenschaften. Indem die nachteiligen Qualitäten minimiert oder eliminiert werden, während der wirksame Charakter bestehen bleibt, kann die therapeutische Effektivität der Verbindungen deutlich erhöht werden. Dies kann auf biologischem, physikalischem und chemischem Wege erfolgen:

- Biologisch: Der Applikationsweg des Arzneistoffs kann verändert werden. Bei schlechter oraler Bioverfügbarkeit etwa kann der Wechsel auf eine parenterale Applikation sinnvoll sein.
- Physikalisch: Die Arzneiform kann dem Wirkstoff angepasst werden. Beispielsweise ist eine verzögerte kontrollierte Freisetzung des Arzneistoffs durch die Arzneiform möglich, wodurch evtl. toxische Plasmaspiegelspitzen vermeidbar sind.
- Chemisch: Der Wirkstoff kann in ein Prodrug überführt werden. Dies stellt die eleganteste Methode zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit oder Selektivität und Verringerung der Toxizität von Verbindungen dar.³¹

Die Bezeichnung Prodrug bezieht sich auf selbst pharmakologisch nicht wirksame und erst durch metabolische Umwandlung in aktive Wirkstoffe überführbare Verbindungen.³² Es gibt viele Umstände, unter denen der Einsatz eines Prodrugs sinnvoll ist:

- Zur Verbesserung der Compliance bzw. der Therapietreue des Patienten, beispielsweise durch Verhinderung schmerzhafter Injektionen,
- zur Erhöhung oder Veränderung der Absorption und der Bioverfügbarkeit, beispielsweise kann eine verzögerte und verlängerte Freisetzung anstelle einer hohen, schnell abfallenden Plasmaspiegelkonzentration des Arzneistoffs erwünscht sein,
- zur Veränderung der Verteilung, des Metabolismus und der Elimination des Wirkstoffs.

Folglich ist die Umwandlung einer Verbindung in ein Prodrug dann besonders hilfreich, wenn die Verbindung schlecht oral bioverfügbar ist, unspezifisch im Organismus wirkt, chemisch instabil ist oder eine hohe Toxizität aufweist. Aber auch weniger bedeutungsvolle Eigenschaften wie ein

schlechter Geschmack und Geruch oder Unannehmlichkeiten während der Applikation können durch die Entwicklung entsprechender Prodrugs verändert werden.³³

Bei der Einteilung von Prodrugs kann zwischen carrierverbundenen Prodrugs und biologischen Vorstufen unterschieden werden. Die an Carrier gebundenen Prodrugs tragen einen leicht durch einfache chemische oder enzymatische Spaltung im Organismus entfernbaren Substituenten. Dazu gehören beispielsweise Ester und Amide. Idealerweise ist der abgespaltene Substituent nicht pharmakologisch wirksam. Biologische Vorstufen werden durch einen Metabolismus in eine andere wirksame Verbindung umgewandelt, beispielsweise Amine in Aldehyde, welche wiederum zu Carbonsäuren metabolisiert werden.³¹ Ein erfolgreiches Prodrug dieser Kategorie ist zum Beispiel das antibakteriell wirksame lipophile Sulfachrysoidin. Dieses wird durch Azospaltung in die hydrophile Wirkform Sulfanilamid überführt und hemmt die essenzielle Folsäuresynthese von Bakterien als Antimetabolit von *p*-Aminobenzoessäure. Die metabolische Aktivierung von dem in der Tumorthherapie eingesetzten Cyclophosphamid findet durch oxidativen Abbau in der Leber statt.³⁴ Das die Nucleinbase Guanin imitierende antivirale Aciclovir wird in infizierten Zellen durch Nucleosidkinasen in die entsprechenden Triphosphate überführt und in das virale Genom eingebaut, was zum Kettenabbruch führt. Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol wird im sauren Milieu des Zielortes, des Magens, durch Protonierung in das cyclische Sulfenamid als aktiver Metabolit umgewandelt.³⁵

1.3.2 Arzneistoffmetabolismus

Für die Entwicklung von Prodrugs sind Kenntnisse über den Arzneistoffmetabolismus unverzichtbar. Jede einem Organismus applizierte Verbindung muss zunächst absorbiert (oder resorbiert) werden. Entscheidend dafür, ob ein Wirkstoff absorbiert wird, sind seine Löslichkeit, seine Lösungsgeschwindigkeit unter physiologischen Bedingungen sowie seine Lipophilie. Eine gute Löslichkeit bei einer hohen Lipophilie ist für die Absorption sehr günstig und führt zur Einordnung in die Klasse I des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (*Biopharmaceutical Classification System*, BCS; siehe Tabelle 1-1). Praktisch sind lipophile Verbindungen allerdings eher schlecht in wässrigen Medien löslich. Weiterhin sind die Molekülgröße und die metabolische Stabilität sowie die Neigung zu Efflux-Substraten von P-Glycoprotein entscheidend.³⁶ Durch eine parenterale Applikation kann die Barriere „Biomembran“ umgangen werden.

Tabelle 1-1 Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS) zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit; I = gut; II = die Löslichkeit ist geschwindigkeitsbestimmend bei der Absorption; III = die Permeabilität ist geschwindigkeitsbestimmend bei der Absorption; IV = schlechte Absorption.³⁷

Eigenschaften der Verbindung		Permeabilität	
		gut	schlecht
Löslichkeit	gut	I	III
	schlecht	II	IV

Christopher Lipinsky hat 1997 die Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Verbindungen in klinischen Studien untersucht und Rückschlüsse auf die Bioverfügbarkeit begünstigende physikochemische Eigenschaften geschlossen. Diese wurden als „*rule of five*“ bekannt:

- Das Molekulargewicht sollte kleiner als 500 g/mol betragen.
- Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P$ sollte kleiner gleich 5 sein.

- Es sollten weniger als 5 Protonendonatoren für Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül vorhanden sein (meist OH oder NH).
- Es sollten weniger als 10 Protonenakzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül vorhanden sein (z.B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome).

Diese empirisch ermittelten Ergebnisse gelten nur für die passive Diffusion durch Biomembranen, also der Absorptionsform, über welche die meisten Fremdstoffe in den Körper gelangen. Bei aktiv über Transporter aufgenommen Verbindungen treten deutliche Abweichungen zu den aufgestellten Regeln auf.^{38,39}

Konnte ein Arzneistoff erfolgreich in den Organismus gelangen, unterliegt er in der Regel zahlreichen Umbauprozessen (siehe Abbildung 1-3). Mit dem ersten Pfortaderblut gelangt die Verbindung in die Leber. Die Bioverfügbarkeit bezeichnet im Vergleich zur Absorption den Anteil des applizierten Wirkstoffs, welcher dem Organismus nach der ersten Leberpassage, dem so genannten „first pass“, noch zur Verfügung steht. Folglich ist die Absorption eine Voraussetzung für die Bioverfügbarkeit. Der „first pass-Effekt“ ist bei lipophilen Verbindungen besonders stark ausgeprägt und vermindert ihre Bioverfügbarkeit.³⁴

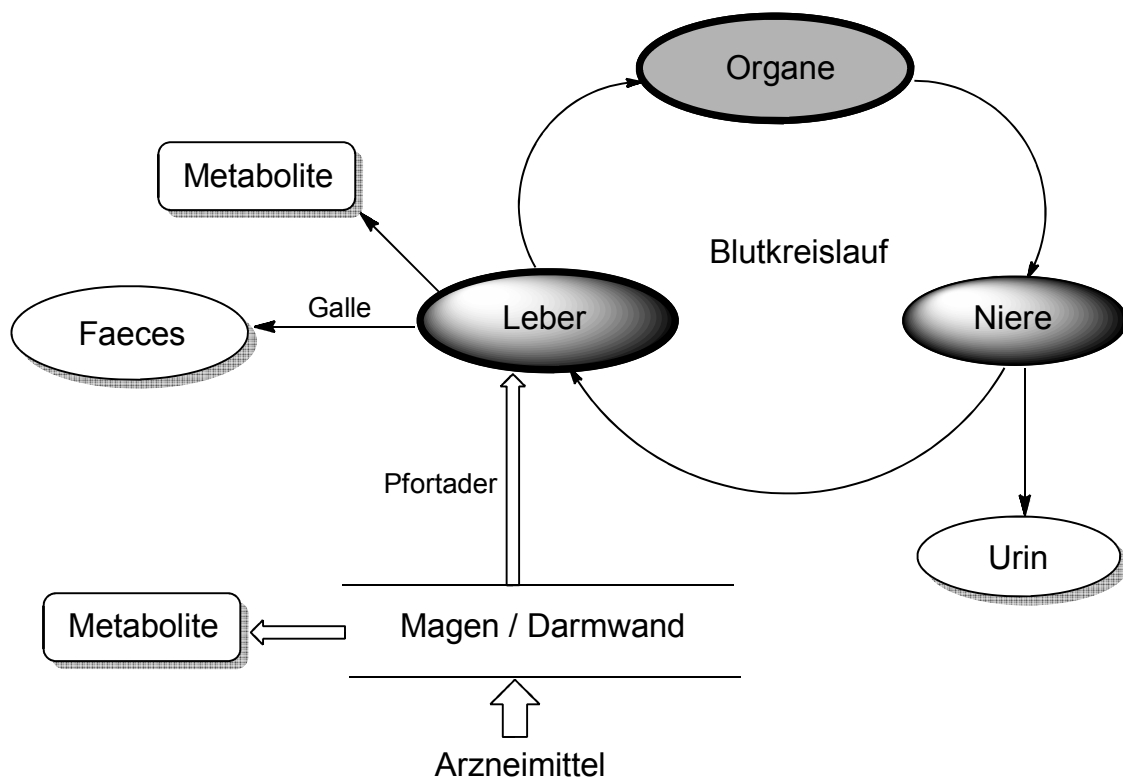


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des Weges eines Arzneistoffs im Organismus nach Klebe [2009].³⁴

Durch Umwandlung in hydrophile Derivate können die Produkte schnell über die Niere eliminiert werden. Hydrolytische Spaltungen, beispielsweise von Estern oder Amiden, führen meist zu wasserlöslichen Abbauprodukten. Außerdem können Konjugationen mit polaren Substituenten wie Sulfatgruppen, Glycin oder Glucuronsäure die Hydrophilie der Verbindungen erhöhen. Enthält das absorbierte Molekül keine leicht abbaubare funktionelle Gruppe und keine mögliche Konjugationsstelle, müssen fremdstoffmetabolisierende Enzyme wie das Cytochrom P450-Enzymsystem (CYP450) aktiv werden. Die durch CYP450 katalysierten Reaktionen stellen

Oxidationsreaktionen dar, durch welche konjugierbare funktionelle Gruppen in den Molekülen entstehen. Diese grundlegenden körpereigenen Mechanismen dienen der Entgiftung von Fremdstoffen und hinterlassen nahezu keine Lücke für den Eintritt von Verbindungen als potenzielle Giftstoffe. Da auch Arzneistoffe vom Organismus als potenzielle Giftstoffe angesehen werden, geht dieser ebenso gegen die heilungsbringenden Verbindungen vor. Gelegentlich kann es nach Absorption von Chemikalien wie etwa polycyclischen Kohlenwasserstoffen auch zur Giftung durch den Organismus kommen, denn hier geht die cancerogene Wirkung der Verbindungen auf einen oxidativen Angriff und die anschließende Epoxidbildung zurück.³⁴ Auf ähnliche Weise dienen die für die Entgiftung verantwortlichen Mechanismen des Organismus der „Giftung“ von Prodrugs, was in diesen Fällen eine erwünschte Aktivierung und Wirkung hervorruft.

1.3.3 Verbesserung der Bioverfügbarkeit

Ein Hauptziel von Prodrugs ist die Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Verbindungen. Dies wird bei hydrophilen Verbindungen durch die Erhöhung der Lipophilie eines Wirkstoffs erreicht. In vielen Fällen sorgen Veresterungen von Säuregruppen und Alkoholen zu weniger hydrophilen, die Biomembranen leichter durch passive Diffusion durchdringenden Derivaten. Aus diesem Grund kann das lipophilere Heroin **2** nach parenteraler Applikation die Blut-Hirn-Schranke überschreiten und zu einer als „Flash“ bezeichneten Anflutung des wirksamen Abbauproduktes Morphin im Gehirn führen (siehe Abbildung 1-4, A). Die Veresterung im Enalapril **3** ermöglicht die nur in lipophiler Form mögliche orale Absorption des blutdrucksenkenden Acetylcholinesterase-Inhibitors (siehe Abbildung 1-4, B). Ein weiterer großer Vorteil von Ester-Prodrugs ist das verbreitete Vorkommen von Esterasen im Organismus. Nach Absorption können die Esterbindungen also schnell und quantitativ gespalten werden und zur Freisetzung der Wirkform führen.

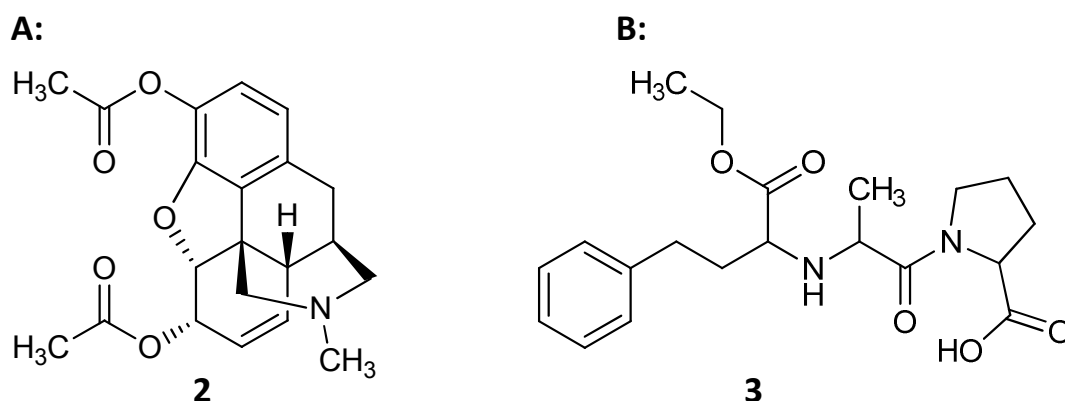


Abbildung 1-4 Erfolgreiche Ester-Prodrugs sind unter anderem A: das Heroin **2** als Prodrug von Morphin und B: das Enalapril **3** als ACE-Hemmer mit blutdrucksenkender Wirkung. Der lipophile Charakter der Ester **2** und **3** ermöglicht die Absorption der Verbindungen. Durch hydrolytische Esterspaltung durch ubiquitär vorkommende Esterasen werden die Verbindungen in ihre Wirkform überführt.

Die Basizität und damit die hydrophile Eigenschaft von Amidinen kann durch elektronenziehende Substituenten wie Hydroxylgruppen verringert werden, was zu einer Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit führt. Weitere Konzepte für Amidine sind in dem folgenden Kapitel 1.3.4 beschrieben.

1.3.4 Prodrug-Prinzipien für Amidine

1.3.4.1 Carbamate und Acylamidine

Die Hydrophilie von Amidinen kann durch die Überführung in Carbamate stark herabgesetzt werden. Die Verbindungen liegen unter physiologischen Bedingungen nicht ionisiert vor. Dadurch erhöht sich ihre orale Bioverfügbarkeit. Wie Ester werden auch Carbamate und Acylamidine durch Esterasen hydrolytisch gespalten. Es entstehen die wirksamen Amidine und Carbonsäuren bzw. Kohlensäureester, welche spontan zu Alkoholen decarboxylieren (siehe Abbildung 1-5).⁴⁰ Carbamate stellen stabile Amidin-Prodrugs dar. Dennoch gibt es eine Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse vom Substituenten der Amidin-Funktion.⁴¹

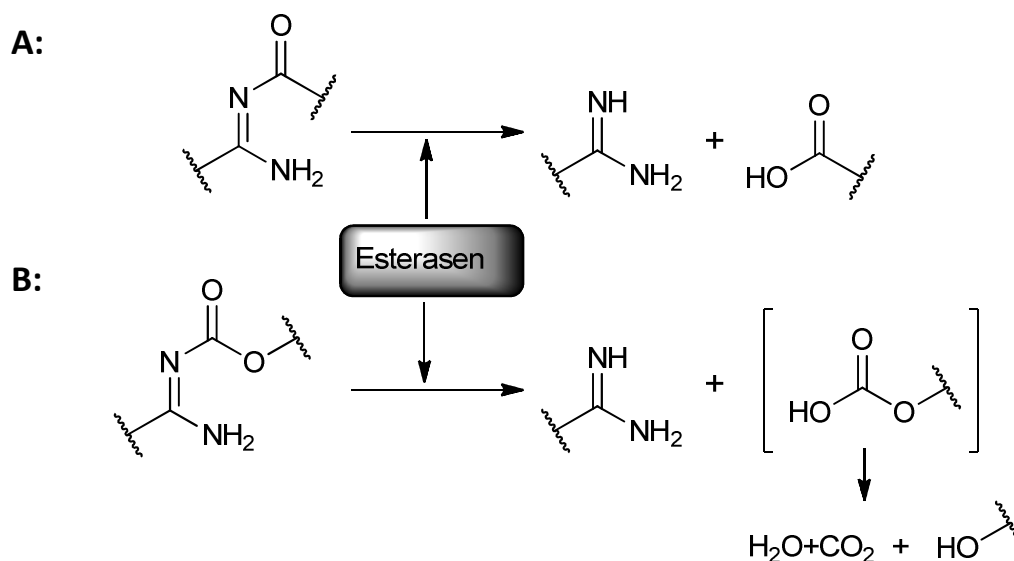


Abbildung 1-5 Acylamidine (A) und Carbamate (B) als mögliche Prodrugs von Amidinen und deren Spaltungsprodukte.

Der antithrombotische Wirkstoff Dabigatran konnte durch Überführung in das Carbamat Dabigatranetexilat (Pradaxa® **4**) und zusätzliche Veresterung der Säuregruppe oral bioverfügbar gemacht werden (siehe Abbildung 1-6). Die Aktivierung zur Wirkform findet durch weit verbreitete Esterasen durch hydrolytische Spaltung statt.^{42,43} Aktuell sind weitere Antikoagulantien in Form von Carbamat-Prodrugs von Amidinen Thema der Forschung. So zeigt das Ethylcarbamat-Prodrug AS1932804-00 als erster Faktor VIIA-Inhibitor bereits gute Wirksamkeit in *in vitro*- und *in vivo*-Studien.^{44,45} Potenzielle Fungizid-Prodrugs in Form von Acylamidinen werden derzeit ebenfalls untersucht.⁴⁶

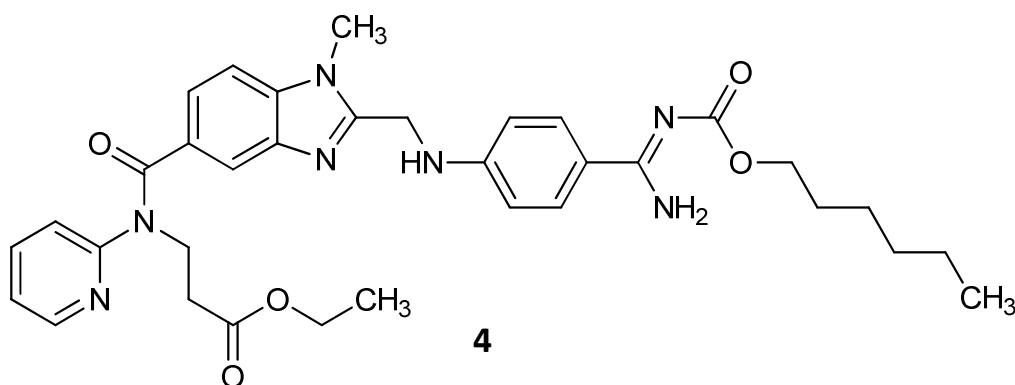


Abbildung 1-6 Der Blutgerinnungshemmer Dabigatran wurde in Form eines Carbamats als Dabigatranetexilat (Pradaxa® 4) auf den Markt gebracht.

1.3.4.2 Amidoxime

Die Basizität von Amidinen kann durch die Einführung einer Hydroxylgruppe stark herabgesetzt werden, was durch den pK_a -Wert von 4.2 im Gegensatz zum pK_a -Wert des unsubstituierten Amidins von etwa 11 deutlich wird.^{4,47} Dies führt zu einer signifikanten Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit amidinhaltiger Wirkstoffe, da unter physiologischen Bedingungen bei pH 7.4 keine Protonierung mehr stattfindet.⁴⁸ Nach dem Durchdringen der Biomembranen werden Amidoxime schnell und quantitativ durch die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) im Zusammenspiel mit Cytochrom-b5 und der Cytochrom-b5-Reduktase zu Amidinen reduziert.^{49,50}

Als Prodrug des Thrombin-Inhibitors Melagatran konnte das *N*-hydroxylierte und zusätzlich an der Säuregruppe veresterte Analogon Ximelagatran (Exanta® 5) als erstes orales Antikoagulant auf den Markt gebracht werden (siehe Abbildung 1-7). Die Aktivierung des Prodrugs erfolgte durch hydrolytische Spaltung des Esters durch ubiquitär vorkommende Esterasen und ebenfalls schneller und vollständiger Reduktion des Amidoxims durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem.⁵¹ Die bei wenigen Patienten nachgewiesene und durch eine Erhöhung der Transaminasen festgestellte Lebertoxizität führte 2006 dazu, dass das Arzneimittel vom Markt genommen wurde. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der toxischen Wirkung auf die Leber und dem Prodrug-Prinzip besteht nicht.

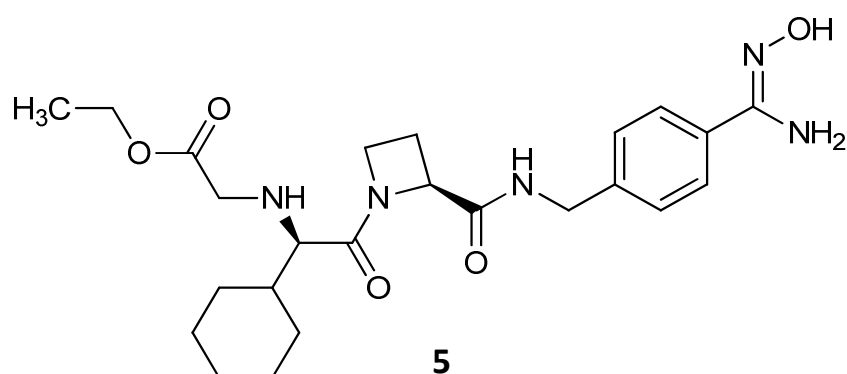


Abbildung 1-7 Ximelagatran 5 war als *N*-hydroxyliertes Amidin-Prodrug der erste orale Thrombin-Inhibitor auf dem Markt.

Das Antikoagulant Sibrafin zeigte als GP IIB/IIIA-Rezeptorantagonist mit hydroxylierter Amidinfunktion ebenfalls eine gute Wirksamkeit in der Thromboseprophylaxe. Allerdings wurde der

Arzneistoff in vergleichenden Untersuchungen als nicht signifikant vorteilhaft gegenüber Acetylsalicylsäure beurteilt und aus diesem Grund nicht weiter verfolgt. Das doppelte Prodrug Sibrafiban wird, ebenso wie Ximelagatran **5**, durch Esterhydrolyse und *N*-Reduktion in die Wirkform überführt.⁹ Weitere Prodrugs dieser Substanzklasse befinden sich aktuell in der Forschung und klinischen Entwicklung.

Das doppelte Prodrug Upamostat (Mesupron®, WX-671 **6**) ist ein nicht-proteinogener Serinprotease-Inhibitor mit antitumoraler Wirkung und befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Entwicklung (siehe Abbildung 1-8).^{52,53} Das Molekül **6** enthält eine veresterte Säuregruppe und eine hydroxylierte Amidinfunktion, wodurch die Lipophilie der Wirkform (WX-UK1) drastisch erhöht wird. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls durch Esterhydrolyse und mARC-abhängige Reduktion des Amidoxims **6**.⁵⁴ Eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und der Metastasierung durch WX-UK1 konnte in Zelllinien nachgewiesen werden.^{55,56} Die Wirkform WX-UK1 hemmt Plasmin direkt und indirekt durch die Inhibition des urokinaseartigen Plasminogen-Aktivatorsystems (uPA), wodurch eine Plasminogen-Aktivierung ausbleibt.⁵⁷ uPA spielt besonders bei Tumordinvasionen und Metastasierung eine Rolle, weswegen Upamostat **6** als antimetastatischer und nicht zelltoxischer Arzneistoff gegen Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs eingesetzt werden soll.^{58,59}

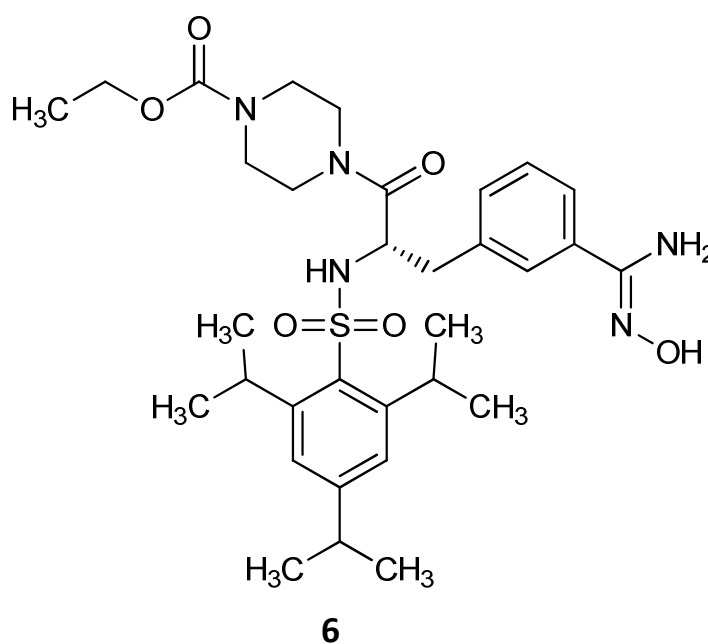


Abbildung 1-8 Das antitumorale Prodrug Upamostat (Mesupron® **6**) befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Entwicklung.

Weiterhin sind eine Reihe von Amidoxim-Prodrugs als Antiparasitika Thema der Forschung, deren Grundstrukturen (3,5-Diphenylisoxazol) Ähnlichkeiten zum Pentamidin **1** und Furamidin aufweisen, aber anstelle einer Pentylkette oder eines Furan-Rings einen Isoxazol-Heterocyclus besitzen. Tierstudien in Mäusen ergaben bereits eine höhere Effektivität der Verbindungen als Pentamidin **1** und Furamidin gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Plasmodium falciparum*.⁶⁰

1.3.4.3 Substituierte Amidoxime

Durch Substitution einer Amidoxim-Gruppe kann die Lipophilie von Molekülen weiter gesteigert und die orale Bioverfügbarkeit erhöht werden. Aufgrund dessen stellen diese Strukturen interessante Ansätze für die Prodrug-Synthese dar.

Mit Hilfe einer Diacetylierung der Amidingruppen des Pentamidins **1** wurde ein Prodrug für das antiprotozoische Arzneimittel geschaffen, wodurch die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung erhöht werden sollte. Das Prodrug wird durch hydrolytische Spaltung, katalysiert durch Carboxyl-Esterasen, und anschließender *N*-Reduktion in die Wirkform überführt. Durch *in vitro*-Untersuchungen mit Mitochondrien und Mikrosomen sowie *in vivo* an Ratten konnte die erfolgreiche Aktivierung zum Pentamidin **1** demonstriert werden.⁶¹

Durch *N*-Methoxylierung des antiprotozoalen Furamidins (DB75) konnte das Prodrug Pafuramidin (DB289 **7**) mit deutlich gesteigerter oraler Bioverfügbarkeit dargestellt werden (siehe Abbildung 1-9).⁶²⁻⁶⁴ Für die Aktivierung zum Diamidin ist im ersten Schritt eine Cytochrom P450-abhängige Demethylierung von **7** notwendig. Die *N*-Reduktion erfolgt schnell und vollständig durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem. Aza-analoge Verbindungen (DB820, DB829) zeigten ebenfalls eine gute Wirksamkeit gegen *Trypanosoma*-Stämme und wurden durch *O*-Methoxylierung (DB844, DB868) in entsprechende Prodrugs überführt.⁶⁵ Die Verbindungen sind Teil der Forschung und eignen sich durch die positiven Ergebnisse von *in vivo*-Tests für die klinische Entwicklung. **7** scheiterte allerdings aufgrund seiner Leber- und Nierentoxizität.⁶⁶

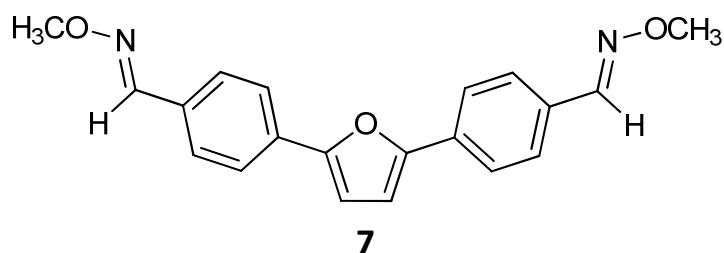


Abbildung 1-9 Das Prodrug Pafuramidin (DB289 **7**) wird durch CYP450 *O*-demethyliert und anschließend mARC-abhängig zur Wirkform Furamidin (DB75) reduziert.⁶⁴

Die strukturell verwandten antiparasitischen Isoxazol-Derivate wurden ebenfalls in methylsubstituierte Amidoxime überführt, um die orale Bioverfügbarkeit zu steigern.⁶⁰ Auch diese Verbindungen zeigten Wirksamkeit und bieten ein Potenzial zur Weiterentwicklung der Medikamente gegen die Afrikanische Schlafkrankheit.

Außerdem wird an einem weiteren Diamidin (TH-701) mit fungizider Wirkung geforscht. Es soll gegen den besonders bei immunodefizienten Patienten auftretenden opportunistischen Pilz *Pneumocystis carinii* eingesetzt werden. Außerdem belegen die *in vitro*-Untersuchungen eine Wirksamkeit von TH-701 gegen *Trypanosoma brucei*. Die Basizität der Amidine wurde durch Überführung in entsprechende Amidoxime, Acylamidoxime und Oxadiazole als Prodrug-Prinzipien herabgesetzt.⁴⁶

1.3.4.4 Dihydroxyamidine

Durch die Derivatisierung der Amidin-Gruppe mit zwei Hydroxy-Substituenten kann die Basizität einer Verbindung gegenüber dem entsprechenden Amidoxim noch weiter herabgesetzt werden. Mit

einem pK_a -Wert von 3.8 liegen Dihydroxyamidine auch im schwach Sauren noch ungeladen, also lipophil, vor und können Biomembranen durchdringen.⁶⁷ Weiterhin ergaben Studien an dem Amidoxim-Prodrug Ximelagatran **5**, dass die orale Bioverfügbarkeit trotz ausreichender Lipophilie auf nur 20 % gegenüber 7 % der Wirkform Melagatran gesteigert werden konnte. Dies wurde mit einer unvollständigen Absorption und einem hohen *first pass*-Effekt erklärt.⁶⁸ Dihydroxyamidine sollen die präsystemische Reduktion zu Amidinen verzögern, indem eine weitere lipophile Vorstufe gebildet wird. So sind zwei Reduktionsschritte zur Bildung des nicht absorbierbaren hydrophilen Wirkstoffs nötig und die Zeit des Vorliegens einer absorbierbaren lipophilen Vorstufe ist erhöht. *In vivo*-Untersuchungen der oralen Bioverfügbarkeit der Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) an Schweinen nach Gabe des Modell-Prodrugs *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9**) bestätigten die Theorie, da die Bioverfügbarkeit von 74 % bei oraler Benzamidoxim (**14**)-Applikation auf 91 % nach oraler Dihydroxybenzamidin **9**-Gabe gesteigert werden konnte.⁶⁹

Daher wurde dieses Prodrug-Konzept auch auf amidinhaltige Arzneistoffe übertragen. Tetrahydroxy-Pentamidin **12** war der erste Wirkstoff mit Dihydroxyamidin-Funktion (siehe Abbildung 1-14). Allerdings stellte die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung **12** sich nach *in vivo*-Untersuchungen an Ratten als niedriger im Vergleich zum veresterten Bissuccinyl-Pentamidin heraus, was eine Weiterentwicklung ausschloss. Beide getesteten Prodrugs konnten zu keiner messbaren Plasmakonzentration der Wirkform Pentamidin **1** führen, jedoch wurde in den Organen wie Leber, Niere, Lunge und Gehirn insgesamt etwas mehr Pentamidin **1** nach Gabe des Bissuccinyl-Prodrugs im Vergleich zur Applikation des Tetrahydroxy-Prodrugs **12** wiedergefunden. **12** unterliegt auch einer leichten Zersetzung zum Trihydroxy-Derivat.⁷⁰

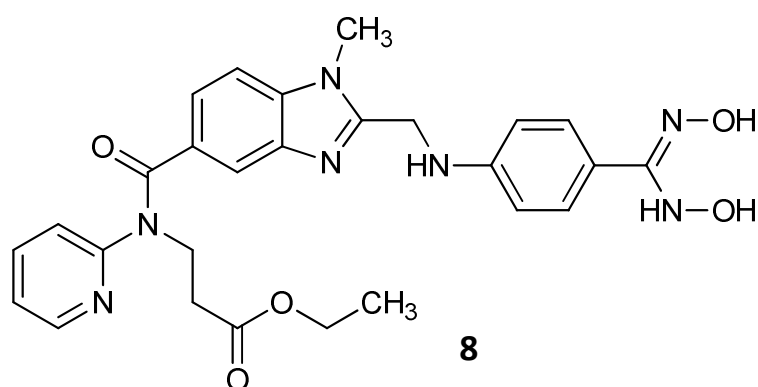


Abbildung 1-10 Dihydroxy-Dabigatran **8** besitzt eine sehr hohe Löslichkeit von 1.2 mM bei pH 7.4. *In vivo*-Untersuchungen ergaben aber eine schlechtere orale Bioverfügbarkeit von Dihydroxy-Dabigatran **8** im Vergleich zu anderen Prodrug-Kandidaten.

Als einziger weiterer Arzneistoff wurde Dabigatran in ein Dihydroxyamidin-Prodrug **8** überführt (siehe Abbildung 1-10). Auch diese Verbindung **8** war entsprechenden veresterten Amidoxim-Prodrugs in *in vivo*-Untersuchungen unterlegen, was eine Weiterentwicklung hemmte. Die orale Bioverfügbarkeit von Dabigatran nach oraler Gabe von Dihydroxy-Dabigatran **8** war überraschend gering. Obwohl *in vitro*-Tests eine enorm gute Löslichkeit im Vergleich zu den anderen Prodrug-Kandidaten im millimolaren Bereich ergaben, konnten *in vivo* keine guten Ergebnisse erzielt werden. Wahrscheinlich führte das alkalische Milieu des Darms zu einem Instabilitätsproblem der Verbindung **8**, woraus ein nichtenzymatischer Abbau vor der Absorption resultierte. Eine entsprechende Formulierung des Prodrugs könnte Dihydroxy-Dabigatran **8** vor der Zersetzung im

Alkalischen schützen und zu einem Vorteil in der oralen Bioverfügbarkeit durch die gute Löslichkeit führen.

1.4 Bisherige Synthesen von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

Als erstes und einfachstes Dihydroxyamidin wurde *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA **9**) bereits 1898 von Ley durch die Reaktion von Benzhydroxamsäurechlorid (BOxCl **18**) mit Hydroxylamin synthetisiert (siehe Abbildung 1-11).⁷¹ Später wurde Dihydroxybenzamidin **9** auch durch die Reaktion von Benzamidoxim (BAO **14**) mit Hydroxylaminhydrochlorid gewonnen und dessen Eigenschaften hinsichtlich des pK_a -Wertes und der Stabilität bestimmt.^{67,72} Mit einem pK_a -Wert von 3.8 liegt **9** im wässrigen physiologischen Milieu neutral und ungeladen vor.⁶⁷ Im Säuren findet eine langsame Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure (BHYS) statt, während unter basischen Bedingungen eine schnelle Zersetzung zu Benzamidoxim (**14**) und Benznitrosolsäure stattfindet, welche selbst instabil ist und zu Benzonitril zerfällt.⁷²⁻⁷⁴ Die Konfiguration von Dihydroxybenzamidin **9** wurde durch Barassin *et al.* [1969] NMR-spektroskopisch untersucht und ergab, dass die *Z*-Konfiguration energetisch bevorzugt ist, da sich für die Stabilität günstige Wasserstoffbrücken ausbilden können.⁷⁵

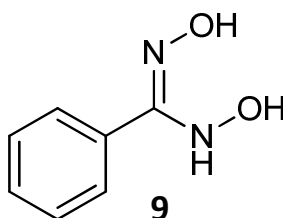


Abbildung 1-11 Das erste und strukturell einfachste *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9**) wurde von Ley *et al.* [1898] synthetisiert.⁷¹

Als einziges *O*-substituiertes Dihydroxybenzamidin wurde *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOBn **10**) 1914 von Ley synthetisiert und dessen Bildung von Komplexsalzen mit Kupferionen untersucht.⁷⁶ Genaue charakterisierende spektroskopische Daten fehlen hier aber, da die Verbindung später in der Literatur nicht mehr auftaucht.

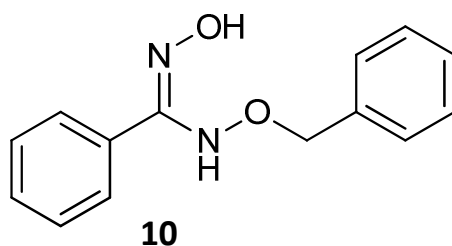


Abbildung 1-12 *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOBn **10**).⁷⁶

In Anlehnung an die Synthesen von Armand *et al.* wurden in den achtziger Jahren verschiedene polyhydroxylierte Dihydroxybenzamidine **11** synthetisiert und mit gasförmiger Salzsäure als Hydrochlorid gefällt (siehe Abbildung 1-13).⁷⁷ Die Verbindungen gehörten zu einer Reihe von Polyphenolen, welche gegen Tumoren in Säugetieren mit einem hohen Ribonucleotidreduktase-spiegel eingesetzt werden sollten und wurden durch van't Riet *et al.* [1984] patentiert.⁷⁷

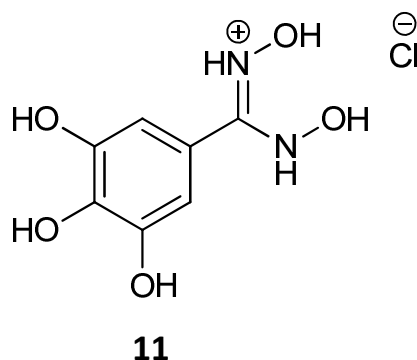


Abbildung 1-13 Einfache polyhydroxysubstituierte Dihydroxybenzamidine wie **11** wurden von van't Riet *et al.* [1984] als Hydrochloride aus den entsprechenden Amidoximen hergestellt.⁷⁷

Als erstes Prodrug eines wirksamen auf dem Markt befindlichen Arzneistoffs gegen die Afrikanische Schlafkrankheit wurde Tetrahydroxy-Pentamidin **12** synthetisiert (siehe Abbildung 1-14).⁷⁰ Pentamidin **1** selbst liegt unter physiologischen Bedingungen positiv geladen vor und muss parenteral verabreicht werden. Durch die Überführung in ein lipophileres Prodrug sollte eine orale Gabe ermöglicht werden, welche besonders für unterentwickelte Länder, in denen Pentamidin **1** benötigt wird, durch die mangelnde Hygiene sinnvoll und von besonderer Bedeutung ist.

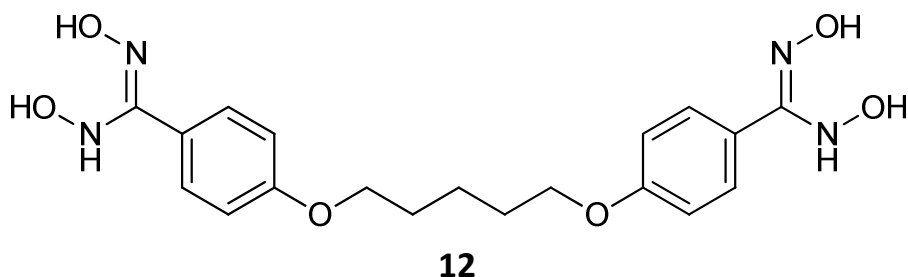


Abbildung 1-14 Das Tetrahydroxy-Pentamidin **12** wurde als Prodrug für das schlecht oral bioverfügbare Pentamidin **1** im Arbeitskreis synthetisiert.^{70,78}

Außerdem wurde der aktive Thrombin-Inhibitor Dabigatran in ein Dihydroxy-Prodrug **8** überführt, wodurch sich die Löslichkeit der Verbindung im Vergleich zum auf dem Markt befindlichen Dabigatranetexilat **4** und weiteren Prodrug-Kandidaten deutlich erhöhte (siehe Abbildung 1-10). Die Synthese stellte sich als aufwändig heraus, da die Oxim-Vorstufe schwer zugänglich war. Ziel dieser Entwicklung war eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit von Dabigatran im Vergleich zu Dabigatranetexilat **4**, welches selbst eine relativ geringe Bioverfügbarkeit von 5-8 % besitzt. *In vivo*-Untersuchungen ergaben allerdings schlechtere Ergebnisse für das in basischen Medien wie dem Darm instabile Dihydroxy-Dabigatran **8**.

Weiterhin konnte bereits eine Reihe cyclischer Dihydroxybenzamidine **13** dargestellt werden (siehe Abbildung 1-15).⁷⁹⁻⁸² Dabei stand in den meisten Fällen die Synthese der Verbindungen **13** im Vordergrund.^{79,80,82} Eine Anwendungsmöglichkeit oder die physikochemischen Eigenschaften der dargestellten Verbindungen wurden nicht ermittelt. Kelly *et al.* [2008] untersuchten Cycloadditionsprodukte nach Einwirkung von Nitriloxid auf die Bakterien *Geobacillus sp.* DDS012 aus Roggensilage, welche offensichtlich cyclische Dihydroxybenzamidine **13** bilden konnten.⁸¹

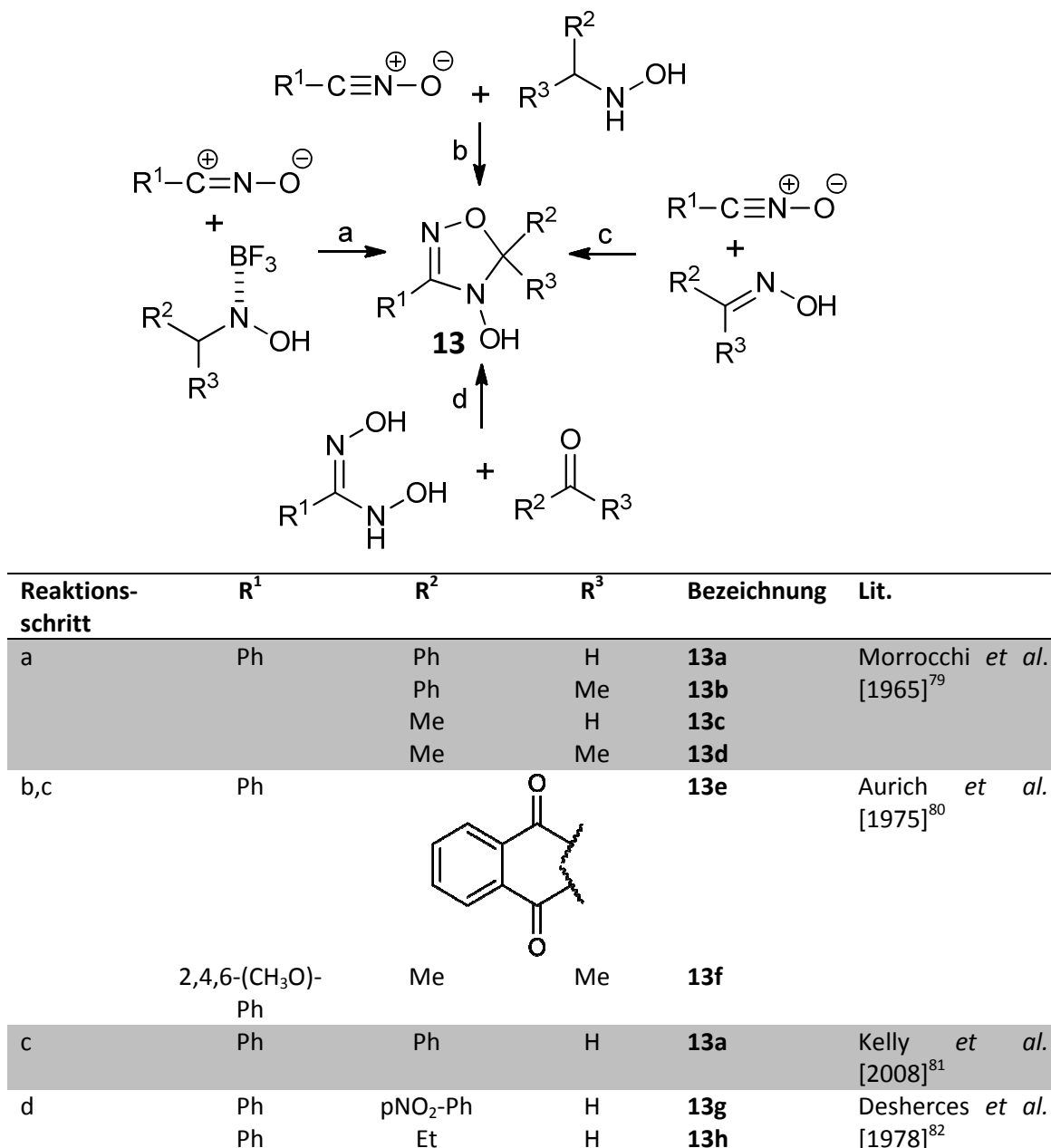


Abbildung 1-15 Es wurde bereits eine Reihe von unterschiedlich substituierten cyclischen Dihydroxybenzamidinen in Form von Oxadiazolen 13 synthetisiert.

1.5 Biotransformation *N*-hydroxylierter Amidine

N-hydroxylierte Verbindungen werden durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem bestehend aus der molybdänhaltigen Komponente mARC (*mitochondrial amidoxime reducing component*), der flavinhaltigen NADH-Cytochrom-b5 Reduktase und dem hämhaltigen Cytochrom-b5 schnell und effektiv reduziert. Im Gegensatz zu den meist mikrosomalen arzneistoffmetabolisierenden Enzymen von Säugetieren befindet sich das mARC-haltige Protein in der äußeren Mitochondrienmembran.^{51,83} Das mARC-Enzym kommt in allen Säugetieren in zwei Isoformen mARC1 und mARC2 vor, von denen eine dominant exprimiert wird. Ein funktioneller Unterschied zwischen mARC1 und mARC2 wurde bisher nicht festgestellt.⁸⁴ Es konnte eine Beteiligung von mARC an der Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter Verbindungen nachgewiesen

werden. So werden *N*-hydroxylierte Amidine und Guanidine, Amidinohydrazone, Amine und Sulfonamide durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert.^{50,84–87} Auch Oxime wurden umgewandelt. Durch seine reduktiven Eigenschaften stellt das mARC-haltige Enzymsystem einen Gegenspieler zu dem oxidierenden Cytochrom P450-Enzymsystem (CYP450) und zu den flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO) dar.

Die physiologische Bedeutung der *N*-Reduktion ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise dient mARC der Entgiftung toxischer hydroxylierter DNA-Basen oder ist am Lipidstoffwechsel beteiligt.^{88,89} Außerdem könnte mARC im körpereigenen NO-Stoffwechsel eine Rolle spielen.⁹⁰

2 ZIELSETZUNG

2.1 Entwicklung einer allgemeinen Synthesestrategie für *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Die *N,N'*-Dihydroxylierung (Abbildung 2-1) bietet ein geeignetes Prodrugs-Prinzip für Amidine, welche als häufige und unerlässliche Strukturen Bestandteile vieler Arzneistoffe sind (siehe Kapitel 1.2). Die Synthese der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine stellte sich in der Vergangenheit als besonders anspruchsvoll heraus, da unerwünschte Nebenprodukte entstehen und keine allgemein anwendbare Synthese beschreibbar war (siehe Kapitel 1.4). Im Rahmen dieser Arbeit soll eine allgemeine Synthesestrategie für *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (Abbildung 2-1) erarbeitet werden, welche die bekannten Probleme umgeht und auf viele Produkte anwendbar ist. Die entscheidenden Bedingungen für das Gelingen oder Nichtgelingen der Synthese von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen müssten außerdem herausgefunden werden. Bei Verbindungen, die Eigenschaften aufweisen, welche die Synthese auf dem allgemeinen Weg verhindern, ist ein möglicher alternativer Syntheseweg zu beschreiben.

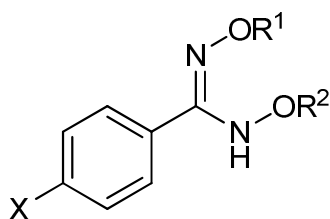


Abbildung 2-1 Allgemeine Struktur von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen.

2.1.1 Synthese von unterschiedlichen Modellsubstanzen

Bisher wurden nur sehr wenige im Entferntesten eine *N,N'*-Dihydroxybenzamidinstruktur (Abbildung 2-1) enthaltende Substanzen hergestellt und beschrieben (siehe Kapitel 1.4). Folglich gibt es keinen bekannten Syntheseweg, der allgemein auf dihydroxyamidinhaltige Verbindungen, anwendbar ist. Ein Ziel der Arbeit ist die Entwicklung eines gemeinsamen Syntheseweges für einige *para*-substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine als Modellsubstanzen (siehe Abbildung 2-1, X = variabel, R^1 , $R^2 = H$).

Zusätzlich zur *para*-Substitution (Abbildung 2-1, Variation von X) sind verschiedene Substitutionen am Sauerstoff (Abbildung 2-1, Variation von X, R^1 und R^2) geplant. Auch hier soll ein gemeinsamer Syntheseweg auf alle Verbindungen anwendbar sein. Auf diese Weise könnte gezeigt werden, dass die entwickelten Syntheserouten auf viele Verbindungen übertragbar sind. Ein weiteres Ziel ist die Ermittlung der Grenzen der Übertragbarkeit durch Bestimmung der Eigenschaften, welche ein Gelingen der Synthesen ausschließen.

2.1.2 Charakterisierung des Effektes des *para*-Substituenten auf die Dihydroxyamidin-Struktur

Es sind bisher nur wenige Eigenschaften der funktionellen Gruppe „Dihydroxyamidin“ bekannt. Der überwiegende Teil der Synthesen, die beschrieben sind, wurden vor über 50 oder gar 100 Jahren durchgeführt (siehe Kapitel 1.4), weswegen charakterisierende spektroskopische Daten fehlen.

Mit Hilfe der synthetisierten Modellsubstanzen der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine soll der Einfluss der *para*-Substituenten auf die funktionelle Gruppe untersucht werden (Abbildung 2-1, Variation von X, $R^1, R^2 = H$). Für mögliche Reaktionen und Wechselwirkungen ist es interessant zu wissen, wie sich die Elektronendichte der einzelnen Atome der funktionellen Gruppe je nach Derivatisierung in *para*-Position X verändert. Die Elektronendichteverteilung und -veränderung soll mittels NMR-Spektroskopie der Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Stickstoffatomkerne untersucht werden. Möglicherweise gibt es Zusammenhänge zwischen den Hammett-Konstanten σ der Substituenten, welche die elektronenziehenden und -schiebenden Einflüsse beschreiben, und der chemischen Verschiebung an bestimmten Kernen der Dihydroxyamidin-Gruppe, also der Elektronendichte an diesen Atomen. Ein solcher Zusammenhang ist nicht unbedingt zu erwarten, da die betreffenden Atome über viele Bindungen durch den Aromaten getrennt sind und elektronenziehende oder -schiebende Effekte möglicherweise nicht über diese Entfernung weitergeleitet werden können. Gibt es aber Korrelationen, kann man jeden Effekt eines beliebigen Substituenten in *para*-Position auf die Dihydroxyamidinfunktion abschätzen, sofern man die elektronischen Eigenschaften dieses Substituenten kennt.

Außerdem soll untersucht werden, inwieweit der *para*-Substituent X einen Effekt auf die Lipophilie der Dihydroxybenzamidine besitzt, da die Lipophilie einer Verbindung ein wesentlicher Parameter für die Bestimmung der Bioverfügbarkeit durch passive Diffusion ist.³⁸

2.1.3 Charakterisierung von *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

Da bis zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenige *O*-substituierte Dihydroxyamidine synthetisiert und beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.4), gibt es auch hier nahezu keine charakterisierenden spektroskopischen Daten, die darüber Aufschluss geben könnten, welche Rolle eine unterschiedliche *O*-Substitution für die Eigenschaften der Dihydroxyamidin-Gruppe spielen könnte. Auch Untersuchungen zur Stabilität und Löslichkeit gibt es bisher nicht.

Der Einfluss der *O*-Substituenten auf die elektronischen Eigenschaften innerhalb der Dihydroxyamidinstruktur soll mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestimmt werden. Außerdem ist vorstellbar, dass die Stabilität der Dihydroxyamidine besonders im basischen und neutralen Medium, in dem unsubstituiertes *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9**) instabil ist, durch eine Substitution an R^1 und R^2 (siehe Abbildung 2-1) signifikant erhöht wird. Dies würde einen deutlichen Vorteil der *O*-substituierten Derivate gegenüber Verbindungen mit freier Dihydroxyamidin-Gruppe bedeuten, da letztere unter physiologischen Bedingungen instabil sind. Auch in der Synthese erweist sich diese Instabilität als Nachteil. Stabilere *O*-substituierte Derivate könnten eine Möglichkeit sein, Synthesewege mit drastischeren Bedingungen zu beschreiten. Stabilitätsuntersuchungen sollen zeigen, ob die *O*-Substitution tatsächlich Vorteile gegenüber der freien Dihydroxyamidinstruktur

aufweist. Außerdem soll der Einfluss der *O*-Derivatisierung auf die Lipophilie untersucht werden, da diese in einem engen Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit steht.

2.2 Untersuchung der Bioaktivierung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

Die Bioaktivierung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA **9**) wurde bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht.^{69,91} Die Umsetzung zum Benzamidin (BA **15**) erfolgt wie beim Benzamidoxim (BAO **14**) schnell durch die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC), Cytochrom b5 und Cytochrom b5-Reduktase (siehe Abbildung 3-1).^{84,92} Die Bioverfügbarkeit des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (**9**) übertrifft die des BAO **14**, da es sich hierbei im Prinzip sogar um das Prodrug eines Prodrugs handelt.⁶⁹ Es reagiert zunächst zu **14**, welches anschließend zum BA **15** umgesetzt wird. Allerdings zerfällt das unsubstituierte Dihydroxybenzamidin **9** aufgrund seiner Instabilität sehr schnell nichtenzymatisch zu Benzamidoxim (**14**), sobald es sich in wässriger physiologischer Umgebung befindet.⁹¹

Weisen die *O*-substituierten Derivate eine höhere Stabilität auf, kann deren rein enzymatische Bioaktivierung untersucht werden. Möglicherweise besitzen sie sogar einen Retard-Effekt, indem sie nur sehr langsam zum Benzamidin (**15**) aktivierbar sind. Dieser könnte dann in Arzneimittelformulierungen ohne einen entsprechenden Film eingesetzt werden und dennoch unerwünscht hohe toxische Dosen im Patienten verhindern. Es soll die Bioaktivierung der *O*-substituierten Dihydroxybenzamidine anhand eines Beispiels *in vitro* mit Mikrosomenfraktionen (Cytochrom P450-haltig) und Mitochondrienfraktionen (mARC-haltig) analysiert werden. Führen die Versuche zu der gewünschten Wirkform – dem BA **15** – sollen *in vivo*-Untersuchungen in Ratten folgen.

2.3 Untersuchung des Einflusses der *N*-Substitution auf die Bioaktivierung von Benzamidoximen

Die Bioaktivierung von Benzamidoxim (**14**) zu Benzamidin (**15**) wurde bereits ausführlich untersucht. Diese Umsetzung dient bei vielen Inkubationen mit dem mARC-Enzymsystem als Positivkontrolle. Außerdem wird die spezifische Aktivität des mARC-Systems mit dieser enzymatischen Reaktion bestimmt (siehe Abbildung 3-1, b).⁸⁴ Auch der Einfluss eines Substituenten am Sauerstoff des Benzamidoxims war bereits Gegenstand der Forschung (siehe Abbildung 2-2).^{54,93}

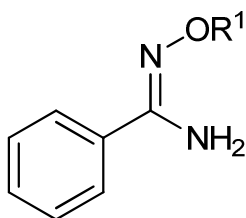


Abbildung 2-2 *O*-Substituierte Benzamidoxime (R^1 = Alkyl) werden zunächst CYP450-abhängig oxidativ *O*-desalkyliert und anschließend durch das mARC-System reduziert.⁵⁴

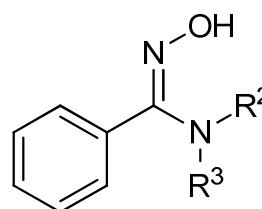


Abbildung 2-3 Der Einfluss der *N*-Substitution (R^2 und/oder $R^3 \neq H$) auf die Metabolisierung des Benzamidoxims soll untersucht werden.

Es ist bisher nicht bekannt, wie sich verschiedene Substituenten am Amin-Stickstoffatom des Benzamidoxims auf dessen Aktivierung zum Benzamidin auswirken (siehe Abbildung 2-3). Man kann erwarten, dass die sterische Hinderung besonders durch große Substituenten R^2 und R^3 zu einer

langsameren Bioaktivierung führt (siehe Abbildung 2-3), also in einem konstanten Zeitraum weniger Benzamidin-Derivat entsteht. Demgegenüber steht der erwartete Effekt, dass ein Elektronenschub durch einen aliphatischen Substituenten zu einer erhöhten Affinität zu dem Enzymsystem und damit in einer schnelleren Umsetzung zum Benzamidin-Derivat resultieren könnte. Aromatische Reste verringern an der Amidoxim-Funktion die Elektronendichte und führen durch ihre Größe zu einer sterischen Hinderung, weswegen damit gerechnet werden kann, dass die Bioaktivierung derartig substituierter Verbindungen vermindert bzw. verlangsamt ist. Mit Hilfe einiger einfacher *N*-substituierter und *N,N*-disubstituierter Benzamidoxim-Modellverbindungen soll der Effekt der unterschiedlichen Reste am Amin-Stickstoffatom analysiert werden (siehe Abbildung 2-3). Dazu ist es notwendig, die Substrate zu synthetisieren und anschließend mit mARC-haltigen Proteinfractionen bei 37 °C über einen bestimmten Zeitraum zu inkubieren. Aus der Menge des entstandenen Metaboliten kann auf den Effekt des Substituenten im Vergleich zu Wasserstoff bei dem *N*-unsubstituierten BAO **14** geschlossen werden.

3 SYNTHESSEN

3.1 Synthese von *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

3.1.1 Einleitung

Die Synthese von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen stellte sich in der Vergangenheit im Arbeitskreis als problematisch und in vielen Fällen als nicht durchführbar heraus.⁷⁰ Der Vorteil einer Dihydroxyamidinstruktur ist aber sehr bedeutend: Durch die Erhöhung der Lipophilie ist die Bioverfügbarkeit der Modells substanz *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9**) der Bioverfügbarkeit des Metaboliten BAO **14** deutlich überlegen. Es konnte *in vivo* signifikant mehr Wirkform-Modell BA **15** bei Gabe des „doppelten Prodrugs“ *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9**) im Vergleich zum Prodrug Benzamidoxim (**14**) nachgewiesen werden.⁶⁹

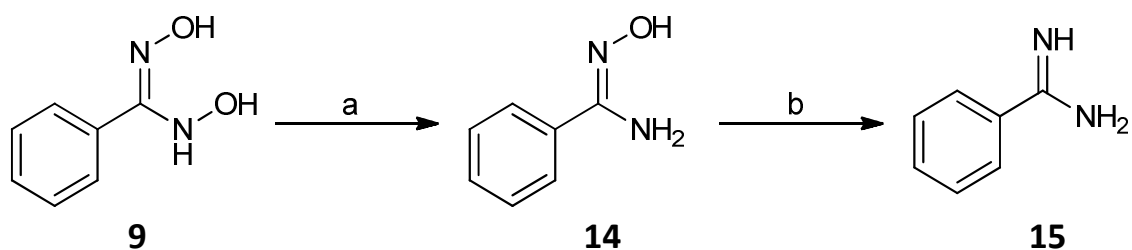


Abbildung 3-1 *In vivo* Reduktion des Prodrug-Modells BDHA **9** über das Benzamidoxim (**14**) zum „Drug-Modell“ Benzamidin (**15**). a: nichtenzymatische Reduktion und enzymatische Reduktion durch mARC; b: enzymatische Reduktion durch mARC.

Somit bietet die Dihydroxyamidinstruktur bei der Überlegung und Erarbeitung neuer Prodrugs enormes Potenzial. Um die Synthese der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine und deren Übertragbarkeit zu studieren, sollten verschiedene *para*-substituierte BDHAs **9** als einfachste Modells substanz dargestellt werden (siehe Abbildung 2-1, R^1 und $R^2 = H$). Besondere Bedeutung kommt dabei Verbindungen mit aktivierten Aromaten zu, also insbesondere Moleküle mit stickstoff- und sauerstoffhaltigen Substituenten X (siehe Abbildung 2-1).

3.1.2 Synthesestrategien

Ausgehend von verschiedenen *para*-substituierten Benzaldehyden (BAld **16**) sollten literaturbeschriebene Umsetzungen zu den entsprechenden *para*-substituierten Benzaldoximen (BOx **17**) durchgeführt werden.^{94–97} Dafür waren schwer beziehbare Aldehyde, zu welchen insbesondere verschiedene *para*-Aminobenzaldehyde (**16a,i,k**) zählten, zuvor zu synthetisieren (siehe Abbildung 3-5 und Tabelle 3-2).

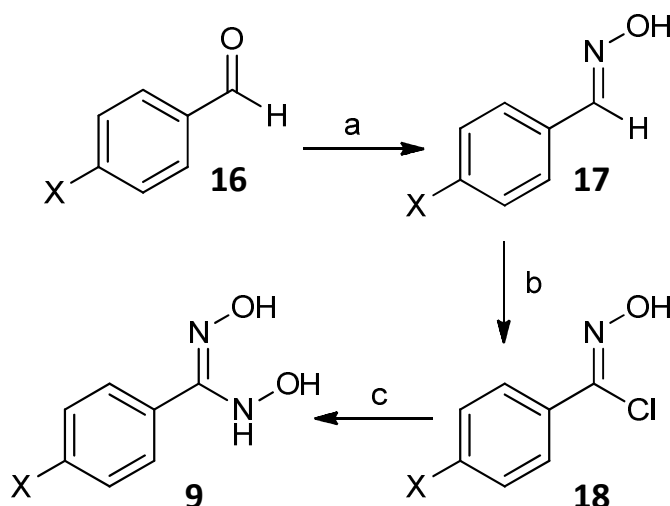


Abbildung 3-2 Syntheseplan *para*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (9) ausgehend von *para*-substituierten Benzaldehyden (16) über die entsprechenden Benzaldoxime (17) und Benzhydroxamsäurechloride (18). a: Hydroxylaminhydrochlorid und Base; b: NCS 26 oder CBCA 24; c: Hydroxylamin als freie Base oder Hydroxylaminhydrochlorid. Die genauen Reaktionsbedingungen sollten bestimmt werden.

Anschließend war die Reaktion dieser Oxime zu *para*-substituierten Benzhydroxamsäuren (BOxCl **18**) mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS **26**) geplant.^{60,98,99} Diese Umsetzung war als problematisch einzustufen, da bekannt war, dass die Synthese in Abhängigkeit von dem Substituenten in *para*-Position mit vielen Nebenprodukten verlaufen konnte. Besitzt der Substituent X einen positiv induktiven und/oder einen positiv mesomeren Effekt (+I- und/oder +M-Effekt), waren zusätzlich zur Chlorierung des Oxims auch Chlorierungen des Aromaten zu erwarten. Aus diesem Grund sollte zusätzlich ein Chlorierungsreagenz hergestellt und getestet werden, welches von Kumar *et al.* [2006] entwickelt wurde und speziell und ausschließlich Oxime chlorieren sollte, das *N-tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (CBCA **24**).^{100,101} Die folgende Reaktion zum *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidin war analog zur literaturbekannten Umsetzung des unsubstituierten Derivates mit Hydroxylamin nach Ley *et al.* [1898] oder mit Hydroxylaminhydrochlorid geplant (siehe Abbildung 3-2).⁷¹

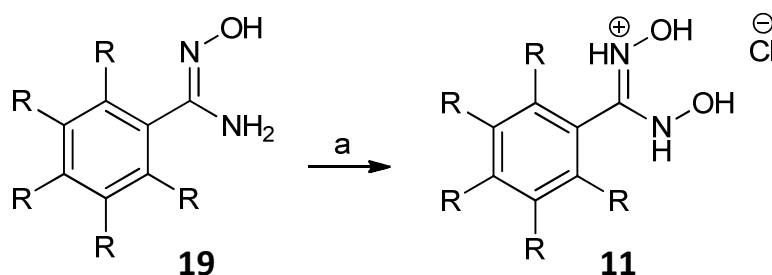


Abbildung 3-3 Van't Riet *et al.* [1984] gelang die Synthese von am Aromaten substituierten Dihydroxybenzamidinen als Hydrochloride 11 aus den entsprechenden Benzamidoximen 19. Die Übertragbarkeit der Methode auf die Herstellung anderer Dihydroxybenzamidine soll getestet werden. a: Hydroxylaminhydrochlorid, Methanol, 50 °C, Ethylacetat, HCl-Gas. R = H, OH.

Außerdem war geplant zu untersuchen, ob eine Umsetzung von BAO **14** mit Hydroxylaminhydrochlorid in Methanol und anschließender Fällung des Produktes als Hydrochlorid in Anlehnung an van't Riet *et al.* [1984] gelingt (siehe Abbildung 3-3).⁷⁷ Es sollte der geeignetere Reaktionsweg evaluiert werden.

3.1.3 *para*-Substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Zunächst wurde BAld **16e** mit Hydroxylaminhydrochlorid zum BOx **17e** und dies mit NCS **26** weiter zum Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) umgesetzt (siehe Tabelle 3-1). Die Reaktionen verliefen, wie in der Literatur beschrieben, in sehr guten Ausbeuten von 95-100 %.^{95,96,98} Die weitere Umsetzung zum *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) verlief nach Ley *et al.* [1898] mit Hydroxylamin als freier Base in Ethanol, wozu die etherische Lösung des Benzhydroxamsäurechlorids (**18e**) getropft wurde, in deutlich besserer Reinheit und Ausbeute gegenüber der Reaktion mit dem Salz Hydroxylaminhydrochlorid.⁷¹ Durch einfache Fällung des Rohproduktes aus Ethylacetat mit Petrolether konnte das reine *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) nach Ley *et al.* [1898] gewonnen werden (siehe Abbildung 3-2).

Die Synthese von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) aus Benzamidoxim (**14e**) mit Hydroxylaminhydrochlorid in Methanol bei 50 °C nach van't Riet *et al.* [1984] hingegen gelang nicht (siehe Abbildung 3-3).⁷⁷ Es konnte dünn-schichtchromatographisch keine charakteristische Blaufärbung nach Besprühen der DC-Platte mit Eisen(III)chloridlösung detektiert werden. Außerdem fiel beim Einleiten von HCl-Gas in die Ethylacetatlösung kein Hydrochlorid aus.

Tabelle 3-1 Mögliche *para*-Substituenten der zu synthetisierenden *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **9** mit den zugehörigen Hammett σ -Konstanten, welche die elektronischen Effekte des Substituenten im Vergleich zu H angeben.

Bezeichnung	a	b	c	d	e	f	g	h
X	NH ₂	OH	OMe	Me	H	Br	CN	NO ₂
Hammett σ -Konstante	-0.57	-0.38	-0.28	-0.14	0	+0.26	+0.70	+0.81
elektron. Effekt	Elektronen-schub ←				kein Effekt	→ Elektronen-zug		

Anschließend wurde *p*-Brombenzaldehyd (**16f**) mit dem -I- aber +M-Effekt besitzenden Substituenten analog zum unsubstituierten Derivat **16e** umgesetzt. Weil der -I-Effekt stark ausgeprägt war, sollte der Aromat des Oxims **17f** nicht stark genug für eine Ringchlorierung aktiviert sein und die kritische Chlorierung sollte gelingen. Die Synthese stellte sich erwartungsgemäß als unproblematisch heraus und das *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) konnte auf beschriebenem Weg in guten Ausbeuten und hoher Reinheit nach Zhang *et al.* [2011] erhalten werden.^{97,99} Auch die Chlorierung mit dem selektiven Chlorierungsreagenz für Oxime, dem *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (CBCA **24**), wurde durchgeführt. Dafür musste das benötigte Reagenz zunächst synthetisiert werden (siehe Abbildung 3-4): Bromcyan wurde in Ether mit *tert*-Butylamin **22** zur Reaktion gebracht und das entstandene Präzipitat durch Filtration entfernt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Tetrachlorkohlenstoff mit *tert*-Butylhypochlorit **21** versetzt, welches zuvor aus *tert*-Butylalkohol **20** und Natriumhypochlorit synthetisiert wurde. Das Rohprodukt wurde durch fraktionierte Destillation in Reinform gewonnen (siehe Abbildung 3-4 und Kapitel 7.1.2.3). Nach Reaktion von *p*-Brombenzaldoxim (**17f**) mit CBCA **24** wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung, wie es in der Literatur empfohlen wurde, weiter umgesetzt.¹⁰² Die anschließende Reaktion zum *p*-Brom-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9f**) war nicht literaturbekannt, gelang aber nach Ley *et al.* [1898] (siehe Abbildung 3-2).⁷¹ Lediglich die Aufreinigung musste angepasst werden, da eine Fällung nicht zufriedenstellend gelang. Es wurde stattdessen eine Flashchromatographie mit einem Fließmittelgradienten aus

Cyclohexan/Ethylacetat über Kieselgel durchgeführt. Nach Anreiben mit Dichlormethan und Absaugen der löslichen Bestandteile unter Vakuum konnte ein feines weißes Pulver erhalten werden.

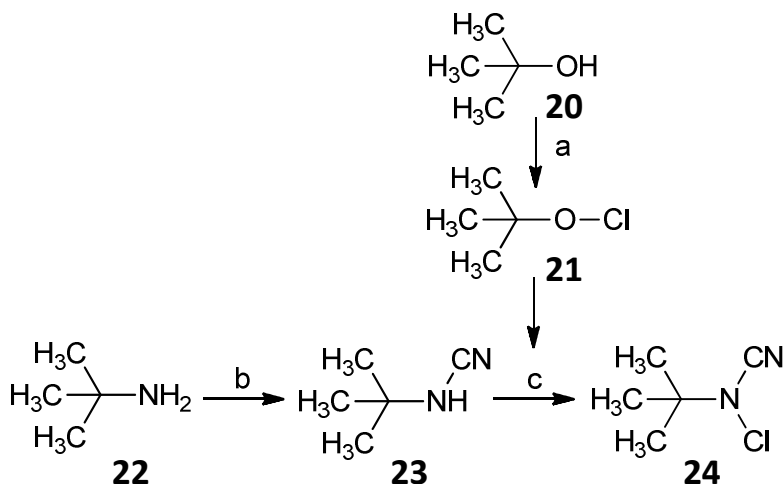


Abbildung 3-4 Synthese des Chlorierungsreagenzes CBCA 24. a: Natriumhypochlorit in Wasser, < 10 °C; b: Bromcyan in Et₂O, 0 °C; c: in Tetrachlorkohlenstoff, 0 °C.

Die Reaktionen mit *p*-Methoxybenzaldehyd (**16c**) verliefen ähnlich unproblematisch bis zur Stufe des *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorids (**18c**) und waren ebenfalls literaturbeschrieben, was durch die ähnlichen elektronischen Effekte (-I und +M) auch zu erwarten war.^{95,103} Auch die Umsetzung mit *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (CBCA **24**), einem selektiven Chlorierungsreagenz für Oxime, gelang.¹⁰² Ohne weitere Aufreinigung konnte das Zwischenprodukt **18c** mit Hydroxylamin in Anlehnung an die Literaturvorschrift von Ley *et al.* [1898] umgesetzt werden (siehe Abbildung 3-2).⁷¹ Die Purifikation des Endproduktes **9c** erfolgte analog zur Synthese des *p*-Brom-*N,N'*-Dihydroxybenzamidins (**9f**) mittels Flashchromatographie und Waschen mit DCM. Es zeigte sich, dass die Synthese über *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (**24**) zu Produkten führte, die schwieriger in Reinform zu isolieren waren. Das Reagenz **24** selbst wurde bei der Flashchromatographie verschleppt und war nur mit einem deutlichen Ausbeuteverlust entfernbare. Aufgrund dessen wurde die Synthese über *N*-Chlorsuccinimid (NCS **26**) für die weiteren Umsetzungen bevorzugt.^{98,100}

Die Reaktionen von *p*-Hydroxy-, *p*-Methyl-, *p*-Cyano- und *p*-Nitrobenzaldehyd (**16b,d,g,h**) bis zum entsprechenden *para*-substituierten BOxCl **18** verliefen wie für die anderen Derivate beschrieben. Die Chlorierung wurde für alle *p*-Substituenten erfolgreich durch die Umsetzung mit NCS **26** erhalten. Für das *p*-Cyanobenzaldoxim (**17g**) wurde die Chlorierung zusätzlich mit dem *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (CBCA **24**) getestet, aber auch hier konnte kein Vorteil gegenüber dem NCS **26** festgestellt werden. Stattdessen verschlechterte sich die Ausbeute durch die nötige aufwändigere Aufarbeitung. *p*-Hydroxy-, *p*-Methyl- und *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18b,d,g**) konnten analog zu den bereits beschriebenen Synthesen zum entsprechenden *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9b,d,g**) umgesetzt werden. Die Reaktion des *p*-Nitro-Derivates **18h** verlief zunächst gewohnt: Ein deutlich blaugrüner Spot nach Ansprühen der DC-Platte mit Eisen(III)chloridlösung zeigte das Produkt **9h** an. Allerdings war die Verbindung **9h** sehr instabil und zersetzte sich spontan unter Gasentwicklung noch vor der Aufreinigung, sodass die gesuchte Verbindung nicht isoliert werden konnte. Aufgrund der offensichtlichen Instabilität von *p*-Nitro-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9h**) erschien ein Syntheserversuch über einen alternativen Reaktionsweg wenig sinnvoll.

Für die Synthese verschiedener *para*-aminosubstituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**9a,i-l**) mussten zuvor die entsprechend substituierten BALd **16a,i,k** hergestellt werden, da diese nur in zur Synthese ungenügenden Mengen und zu einem sehr hohen Preis käuflich zu erwerben waren (siehe Abbildung 3-5 und Tabelle 3-2). Die hohen Kosten waren durch die Notwendigkeit der frischen Synthese, weil nicht vollständig substituierte Amine andernfalls mit Aldehyden leicht eine Reaktion zu einer Schiff'schen Base eingehen können, nachvollziehbar.¹⁰⁴

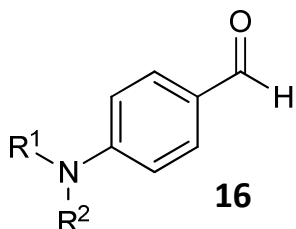


Abbildung 3-5 Die unterschiedlich substituierten *p*-Aminobenzaldehyde **16a,i,k** (siehe Tabelle 3-2) wurden teilweise selbst synthetisiert.

Tabelle 3-2 Auflistung und Bezeichnung der verwendeten Substituenten von *p*-Amino-Derivaten.

Bezeichnung	R ¹	R ²
a	H	H
i	Me	H
k	Et	H
l	Me	Me

Eine Ausnahme war der *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (**16l**), welcher kommerziell erhältlich war. Dieser wurde erfolgreich und in guten Ausbeuten nach einer Literaturvorschrift von Ismail *et al.* [2008] mit Hydroxylaminhydrochlorid und Natronlauge in Wasser unter Rückfluss zum entsprechenden Oxim **17l** umgesetzt.¹⁰⁵ Anschließend sollte das Produkt selektiv an der Oximfunktion zu **18l** chloriert werden. Diese Umsetzung wurde bereits im Vorfeld als problematisch eingestuft, da der Substituent in *para*-Position des Aromaten den Ring durch seinen ausgeprägten +M-Effekt stark aktivieren könnte. Dadurch würde die Elektronendichte des Aromaten erhöht, sodass dieser leichter ein Elektronenpaar für eine Bindung zur Verfügung stellen könnte, also in einem größeren Ausmaß reagierte. Zunächst wurde das bekannte und bewährte Chlorierungsreagenz NCS **26** eingesetzt.⁹⁸ Wie befürchtet kam es bei der Umsetzung bevorzugt zur Ringchlorierung, was dem NMR-Spektrum durch das Wegfallen der typischen dublettähnlichen Signale des AA'XX'-Systems der *para*-substituierten Aromaten zweifelsfrei entnommen werden konnte. Es wurden außerdem Produkte nachgewiesen, die sowohl am aromatischen Ring als auch an der Oximstruktur chloriert waren. Dies war an dem zusätzlichen Wegfall des NMR-Signals des Oxim-CH-Protons bei 9 ppm zu erkennen. Generell war auffällig, dass viele verschiedene Produkte entstanden. Normalerweise lieferte die Synthese ein sehr reines Produkt und es bedurfte keiner weiteren Aufreinigung mit Ausnahme des Ausschüttelns mit Ether gegen eine wässrige Phase. Hier hingegen entstand eine Vielzahl an Verbindungen, ohne dass ein dominantes Hauptprodukt erkennbar war. Aufgrund dessen wurde eine leichte Abwandlung der Synthese nach einer Literaturvorschrift von Poplawska *et al.* [2010] vorgenommen.¹⁰⁶ Die Reaktion wurde in Chloroform unter Zusatz der Hilfsbase Pyridin durchgeführt. Anders als in der Literatur beschrieben konnte das Produkt **18l** auf diese Weise nicht isoliert werden. Dieser bekannten Problematik wurde mit einem Wechsel des Chlorierungsreagenzes zu CBCA **24** begegnet. Auch hier wurde bereits mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt, dass viele Reaktionsprodukte ohne eine deutlich dominierende Komponente entstanden. Die Reaktion verlief also nicht so, wie es von den bereits getesteten Derivaten (*p*-Brom, *p*-Cyano- und *p*-Methoxybenzaloxim **17f,g,c**) bekannt war und wie es der Literatur entnommen wurde: Es sollte bei Umsetzung in trockenem Dichlormethan selektiv, binnen einer Minute und ohne Auftreten von Nebenprodukten Oxime **17** chlorieren. Die Produkte **18** sollten ohne weitere Aufreinigung für die folgenden Synthesen einsetzbar sein.¹⁰¹ Die gesuchte Verbindung **18l** konnte allerdings trotz

flashchromatographischer Isolierung der einzelnen Produkte nicht detektiert werden. Aufgrund dessen war *p*-Dimethylamino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9i**) nicht synthetisierbar.

p-Methylaminobenzaldehyd (*p*NMe-BALd **16i**) wurde erfolgreich durch eine Ullmann-Aminierung von *p*-Brombenzaldehyd (**16f**) mit Methylamin und feinem Kupferpulver als Katalysator in wässriger Lösung bei 100 °C in einem verschlossenen Reaktionsgefäß über 20 h hergestellt (siehe Abbildung 3-6).^{107,108} Ein nicht in der Literatur beschriebenes Nebenprodukt der Synthese war das *p*-Methylaminobenzmethylimin (**25i**), welches nicht ohne größere Ausbeuteverluste von dem gewünschten Produkt **16i** abgetrennt werden konnte und eine Folge der leichten Aminierung der Aldehydgruppe zu einer Schiff'schen Base war.¹⁰⁴ Allerdings stellte sich bei der anschließenden Umsetzung zum entsprechenden Oxim **17i** nach Gawinecki *et al.* [1998] heraus, dass beide Ausgangsverbindungen **16i** und **25i** zum *p*-Aminobenzaldoxim (*p*NMe-BOx **17i**) reagierten.⁹⁶ Eine Abtrennung des Nebenproduktes **25i** der Aldehyd-Synthese war also fortan nicht mehr nötig.

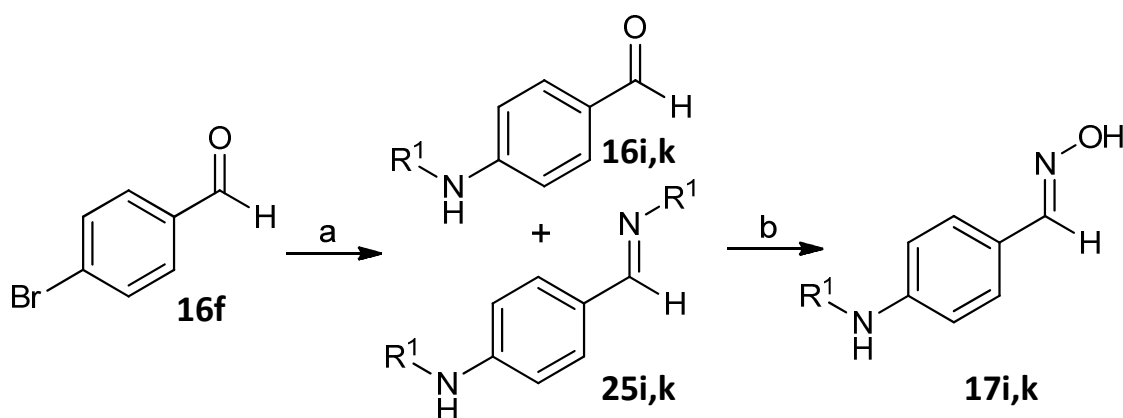


Abbildung 3-6 Die Synthese der *p*-Aminobenzaldehyde (**16i,k**) führte zu zwei Produkten **16i,k** und **25i,k**, welche aber beide zu *p*-Aminobenzaloxim (**17i,k**) reagierten. a = Alkylamin, Kupfer, Wasser, 100 °C; b = Hydroxylaminhydrochlorid, Kaliumcarbonat, Wasser/Ethanol, RT. R^1 = Me (i), Et (k) (siehe Abbildung 3-5, Tabelle 3-2).

Das synthetisierte *p*NMe-BOx **17i** wurde anschließend mit NCS **26** auf bekannte und vielfach durchgeführte Weise zu *p*-Aminobenzhydroxamsäurechlorid (**18i**) umgesetzt.⁹⁸ Auch der *p*-Methylamino-Substituent weist einen +M-Effekt auf, weswegen Ringchlorierungen wahrscheinlich waren (siehe Abbildung 3-7). Nach Auswertung der NMR-Daten des chromatographierten Produktes konnten die Annahmen bestätigt werden: Der Aromat wurde bevorzugt unspezifisch chloriert. Außerdem zeigte das Fehlen des Protons der *p*-Methylamino-Gruppe die Chlorierung dieses Strukturelementes an. Das Oxim-Proton war weiterhin detektierbar, woraus geschlossen werden konnte, dass das elektronenreiche aromatische Strukturelement und die Aminogruppe in *para*-Position für die Chlorierung mit NCS **26** sehr viel aktivierter waren, als das umzusetzende Oxim. Diese Problematiken waren nicht überraschend und sollten durch die Verwendung des neuen Chlorierungsreagenzes CBCA **24** umgangen werden können.¹⁰¹ Leider wurde durch den Wechsel des Reagenzes aber kein besseres Ergebnis erzielt. Lediglich die Produkte der Chlorierung unterschieden sich etwas: Mit dem CBCA **24** erhielt man mehrfach chlorierte Aromaten sowie ebenfalls an der *p*-Methylamino-Gruppe chlorierte Verbindungen. Eine Chlorierung des Oxims konnte auch hier nicht erreicht werden, was NMR-spektroskopisch zweifelsfrei durch das noch vorhandene Oxim-Proton bei 9 ppm nachgewiesen wurde.

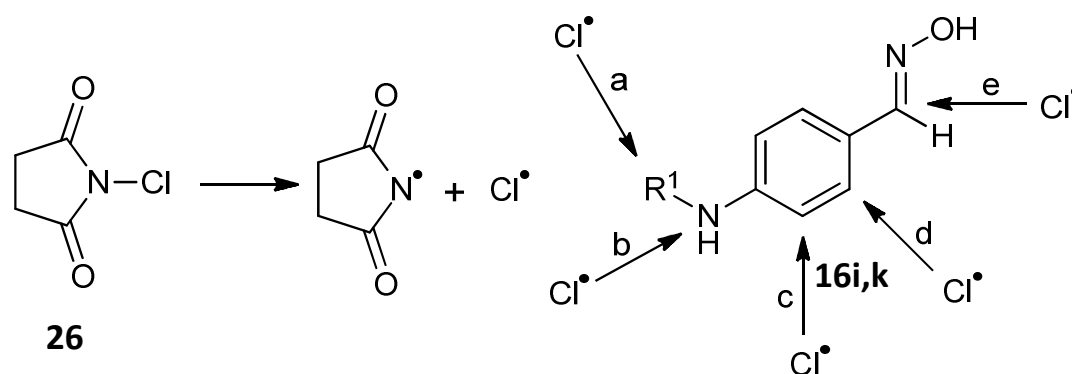


Abbildung 3-7 Theoretische Chlorierungsmöglichkeiten von *p*-Aminobenzaloximen (**16i,k**) mit Chlorierungsreagenzien wie zum Beispiel NCS **26** über einen radikalischen Mechanismus. Neben der gewünschten Chlorierung nur an e könnte es zur Chlorierung des Aromaten (c, d), des *para*-Amino-Stickstoffs (b) und dessen Substituenten (a) kommen. R¹ = Me (**i**) oder Et (**k**).

Da die Vielzahl der entstandenen Produkte unüberschaubar schien, wurde dennoch eine Umsetzung des nicht chromatographierten Rohproduktes mit Hydroxylamin auf bekannte Weise in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.⁷¹ Das gesuchte *p*-Methylamino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9i**) sollte durch Anfärben der DC-Platte mit wässriger 2 %iger Eisen(III)chloridlösung sofort und deutlich durch das Auftreten blauer Spots erkennbar sein. Es war zu erwarten, dass sich alle Hydroxamsäurechloride, also auch solche, die zusätzlich am Aromaten chloriert waren, umsetzen und eine Blaufärbung hervorrufen würden. Tatsächlich konnte aber keine derartige Verfärbung detektiert werden. Da die Farbreaktion sehr empfindlich war, konnte das Vorhandensein des gesuchten *p*-Methylaminobenzhydroxamsäurechlorids (**18i**) oder eines anderen am Oxim chlorierten Produktes auch auf diese Weise ausgeschlossen werden. Die Synthese von *p*-Methylamino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9i**) war somit ebenfalls nicht erfolgreich.

Auch *p*-Ethylaminobenzaldehyd (**16k**) war nicht kommerziell erhältlich und musste zunächst synthetisiert werden. Dazu wurde *p*-Methoxybenzaldehyd (**16c**) mit Ethylamin in wässriger Lösung bei 150 °C über 40 h in einem verschlossenen Reaktionsgefäß nach Literaturvorschrift von Yudin *et al.* [1983] zur Reaktion gebracht.¹⁰⁹ Nach flashchromatographischer Isolierung der Reaktionsprodukte konnte die gesuchte Verbindung nicht dünnschichtchromatographisch oder NMR-spektroskopisch detektiert werden. Es hatte sich kaum etwas von der Ausgangsverbindung umgesetzt. Alle Produkte enthielten weiterhin eine *p*-Methoxy-Gruppe, was deutlich mit Hilfe der ¹H-NMR-Technik in Form eines Singulett bei 3-4 ppm nachvollzogen werden konnte. Es fand keine nucleophile Substitution in *para*-Position des Aromaten statt. Hingegen reagierte der Aldehyd **16c** mit dem Amin nach nucleophiler Addition an das Aldehyd-Kohlenstoff-Atom zu einer Schiff'schen Base. Aufgrund des Scheiterns der literaturbeschriebenen Umsetzung wurde die Herstellung des *p*-Ethylaminobenzaldehyds (**16k**) analog zur Synthese von *p*-Methylaminobenzaldehyd (**16i**) mit *p*-Brombenzaldehyd (**16f**) durchgeführt.^{107,108} Das gesuchte Produkt **16k** konnte auf diese Weise chromatographisch isoliert werden, obwohl die Reaktion unvollständig und deswegen mit eher schlechten Ausbeuten verlief. Auch hier wurde neben dem erwünschten Aldehyd **16k** auch das *p*-Ethylaminobenzethylimin (**25k**) erhalten, was aber ebenfalls durch die Reaktion mit Hydroxylaminhydrochlorid und Kaliumcarbonat zum entsprechenden Oxim **17k** umgesetzt werden konnte (siehe Abbildung 3-6). Die anschließende Chlorierungsreaktion wies dieselben Problematiken auf wie die Chlorierung des *p*-Dimethylamino- und des *p*-Methylamino-Derivates **17l,i**. Auch hier war der Aromat durch den Substituenten aktiviert, weswegen Nebenprodukte durch Ringchlorierung zu erwarten waren (siehe Abbildung 3-7). Die Umsetzungen mit NCS **26** und CBCA **24** verliefen beide

nicht erfolgreich. Wie bei den anderen *p*-Amino-Verbindungen **17l,i** entstanden viele Chlorierungsprodukte, allerdings kein Hydroxamsäurechlorid **18k**. Aufgrund dessen konnte das *p*-Ethylamino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9k**) nicht synthetisiert werden.

Da auch der *p*-Aminobenzaldehyd (**16a**) nur in geringen Mengen und zu einem hohen Kaufpreis kommerziell zu erwerben war, wurde es nach einer Literaturvorschrift von Bellamy *et al.* [1984] hergestellt.¹¹⁰ Dazu wurde das entsprechende *p*-Nitro-Derivat **16h** mit Zinnchlorid in Ethanol unter Rückfluss umgesetzt. Der Reaktionsverlauf konnte durch den zu beobachtenden Farbwechsel von leuchtend gelb zu rot nachvollzogen werden. Das Produkt **16a** wurde nach Extraktion direkt auf bekannte Weise zum entsprechenden Oxim **17a** umgesetzt. Die folgende problematische Chlorierung führte aus bereits erwähnten Gründen sowohl mit NCS **26** als auch mit CBCA **24** nicht zum *p*-Aminobenzhydroxamsäurechlorid (**18a**). Auf diesem Reaktionsweg konnte also auch das *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) nicht erhalten werden.

Als einfachstes phenyloges *N,N'*-Dihydroxyguanidin weckte dieses Derivat **9a** allerdings besonderes Interesse. Aufgrund dessen wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein alternativer Reaktionsweg erarbeitet (siehe Abbildung 3-8).

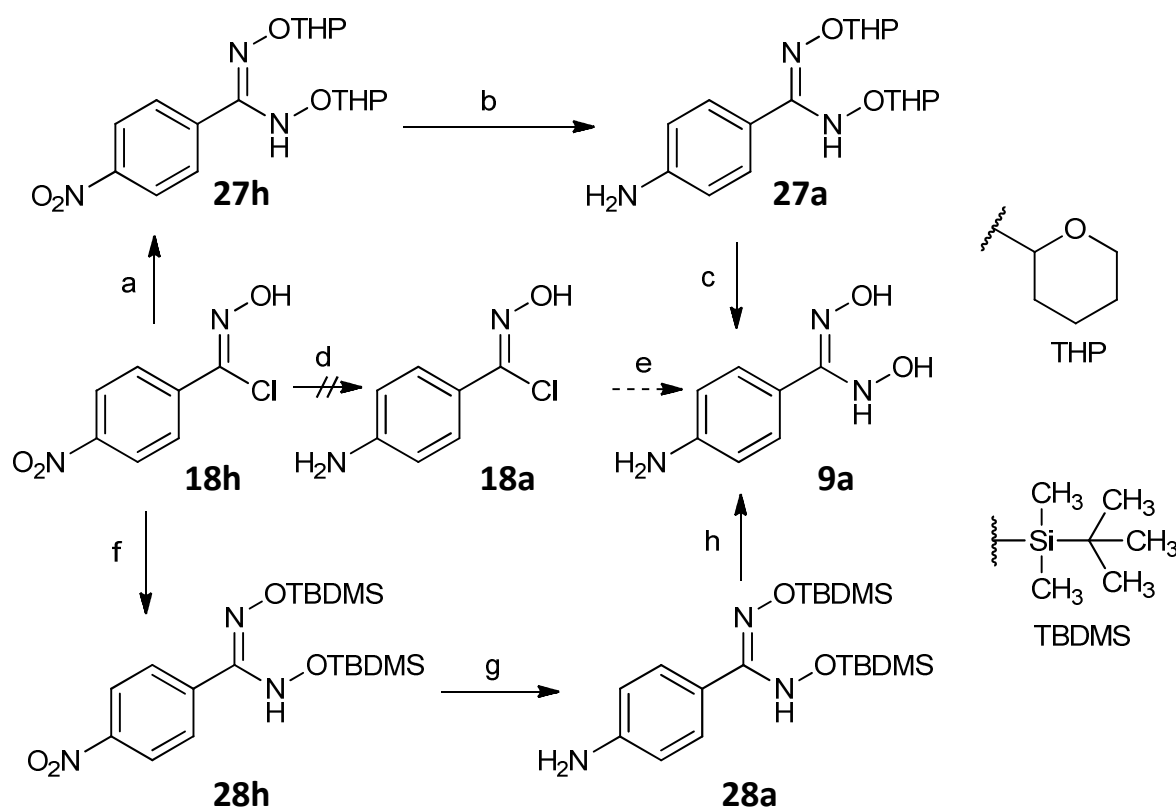


Abbildung 3-8 Getestete alternative Syntheserouten für die Darstellung von *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**), welches über den klassischen Reaktionsweg (siehe Abbildung 3-2) nicht zugänglich war. a: Tetrahydropyran-4-ol in DCM; b: Natriumdithionit in Wasser/Tetrahydrofuran; c: *p*-Tosylsulfonsäure in Methanol; d: Reduktionsversuche mit Wasserstoff/Pd/C, Cyclohexen/Pd/C und Natriumdithionit scheiterten; e: nicht möglich; f: *tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (**42**) in DCM; g: Natriumdithionit in Wasser/Tetrahydrofuran; h: Ammoniumfluorid in Methanol.

Da die Synthese des *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorids (**18h**) problemlos verlief, wurde zunächst versucht, eine gezielte Reduktion der *p*-Nitro-Gruppe zu erreichen. Dafür wurde *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) nach einer klassischen Methode mit Wasserstoff und Palladium als Katalysator unter einem Druck von 2 bar bei Raumtemperatur in der Hydrierapparatur umgesetzt,

wodurch aber nur *p*-Aminobenzamidin (**15a**) entstand.¹¹¹ Die Reduktion verlief also zu drastisch und reduzierte nicht nur die Nitro- zur Amino-Gruppe, sondern zerstörte auch die Hydroxylamin-Funktion. Folglich wurde eine mildere Reduktionsmethode mit Cyclohexen und Palladium-Katalysator in Methanol in der Mikrowelle getestet.¹¹² Durch die beschleunigte Reaktion in der Mikrowelle konnten viele Versuche mit unterschiedlichen Temperaturen, Zeiten und Watt-Leistungen in kurzer Zeit getestet werden, aber auch diese Methoden führten nicht zum Erfolg sondern lieferten verschiedene Produkte wie etwa *p*-Aminobenzamidin (**15a**), *p*-Aminobenzaldoxim (**17a**) sowie das in *para*-Position nicht reduzierte *p*-Nitro-Derivat **17h**. Daraufhin wurde als weiteres mildes Reduktionsreagenz das Natriumdithionit getestet, was ebenfalls zu einem Verlust der Hydroxamsäuregruppe führte (siehe Abbildung 3-8, d).¹¹¹

Aus den genannten Gründen wurde entschieden, dass weitere Versuche über ein geeignetes Schutzgruppenkonzept laufen sollten. Dafür wurde das Hydroxamsäurechlorid **18h** zunächst zum THP-geschützten *p*-Nitro-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (*p*NO₂-BDHA2OTHP **27h**) umgesetzt und mit Natriumdithionit zum *p*-Amino-Derivat **27a** reduziert (siehe Kapitel 3.2.3.3).^{111,112} Die Schutzgruppen des so erhaltenen Produktes **27a** konnten nach einer Literaturvorschrift mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in Methanol bei Raumtemperatur über einen Tag entfernt werden (siehe Abbildung 3-8; a, b, c).¹¹³ Das Produkt wurde anschließend chromatographisch aufgereinigt, mit Dichlormethan angerieben und die löslichen Bestandteile abgesaugt. Das *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) konnte auf diesen Umweg in Reinform gewonnen werden. Da die Ausbeute von knappen 20 % noch nicht zufriedenstellend war, wurde zunächst eine weitere Methode der Abspaltung der Tetrahydropyranylschutzgruppe nach Kim *et al.* [1987] getestet, die etwas milder verlaufen sollte und für Ethoxyetherschutzgruppen entwickelt wurde.¹¹⁴ Mit Magnesiumbromid als Reagenz in Ether konnte der Tetrahydropyranyl-Rest aber nicht abgespalten werden. Anschließend wurde eine weitere Hydroxyschutzgruppe getestet. Dafür wurde *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) mit dem zuvor synthetisierten *tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (TBDMSHA **42**) zu dem entsprechend geschützten Dihydroxyamidin *p*NO₂-BDHA2OTBDMS **28h** umgesetzt. Nach Reduktion gelang die Abspaltung der Schutzgruppen mit Ammoniumfluorid in Methanol in Anlehnung an eine Synthese von Zhang *et al.* [1992] mit anschließender Aufreinigung zu 40 % (siehe Kapitel 3.2.3.4 und Abbildung 3-8; f, g, h).¹¹⁵ Wie erhofft konnte die Ausbeute an *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) durch die alternative Schutzgruppe TBDMS deutlich erhöht werden.¹¹⁶

3.1.4 Physikochemische Eigenschaften

3.1.4.1 Stabilitätsuntersuchungen

Zur vergleichenden Demonstration der Ergebnisse sind die Untersuchungen zur Stabilität zusammenfassend in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben.

3.1.4.2 Bestimmung der Löslichkeit

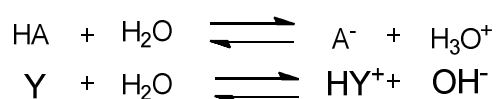
Zur vergleichenden Demonstration der Ergebnisse sind die Untersuchungen zur Löslichkeit zusammenfassend in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben. Es wurde nur die Löslichkeit von BDHA **9e** bestimmt und mit *O*-substituierten Verbindungen verglichen. Der Einfluss des *para*-Substituenten auf die Löslichkeit wurde nicht näher untersucht.

3.1.4.3 Berechnung der pK_a -Werte

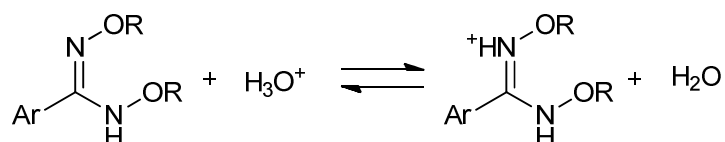
3.1.4.3.1 Einleitung

Der pK_a -Wert ist ein Maß für die Säurestärke einer Verbindung.¹¹⁷ Je kleiner dieser ist, desto stärker ist die entsprechende Brønsted-Säure HA und desto leichter gibt sie ein Proton an die Umgebung ab, wobei im wässrigen Lösungsmittel H_3O^+ -Ionen entstehen (siehe Formel 1). Nur in stark sauren Medien mit einem pH-Wert unterhalb des pK_a -Wertes der Verbindung verbleibt das Wasserstoffatom an der Substanz. Brønsted-Basen hingegen können Protonen aufnehmen und liegen anschließend positiv geladen vor. Substituenten mit -I- und -M-Effekt erhöhen die Säurestärke einer Verbindung bzw. verringern deren Basizität.¹¹⁸ Eine starke Base zeichnet sich durch einen großen pK_a -Wert aus. Im Falle von BDHAs **9** als Brønsted-Basen findet die Protonierung am doppelt gebundenen Stickstoff statt, da es die basischeren Eigenschaften besitzt (siehe Formel 2).⁶⁷ Außerdem ist eine Deprotonierung der *O*-unsubstituierten Verbindungsgruppe der *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **9** im Basischen denkbar (siehe Formel 3). Die Größe der pK_a -Werte von Verbindungen hat eine besondere Bedeutung für die Bioverfügbarkeit: Geladene Verbindungen sind meist gut löslich, allerdings ist ihre Lipophilie und damit ihre Permeabilität verringert. Somit ist der pK_a -Wert einer Substanz ein wichtiger Parameter für die Einschätzung der oralen Bioverfügbarkeit und die Einordnung in das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem BCS (siehe Tabelle 1-1).³⁷

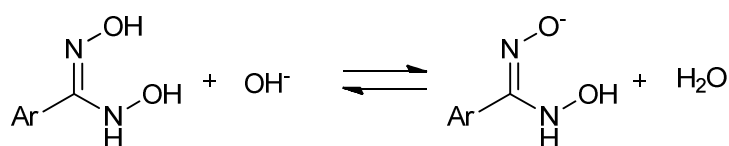
Formel 1 Allgemeine Gleichgewichtsreaktion einer Brønsted-Säure HA bzw. einer Brønsted-Base Y in Wasser.



Formel 2 Gleichgewichtsreaktion von *O*-substituierten BDHAs als Brønsted-Basen im Sauren.



Formel 3 Gleichgewichtsreaktion von BDHAs **9** als Brønsted-Säuren im Basischen.



3.1.4.3.2 Durchführung

Es wurden die pK_a -Werte der Stickstoffatome der Dihydroxyamidin-Gruppe von allen synthetisierten *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (BDHA **9**), *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHAOMe **31/31'**), *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHAOBn **10/10'**), *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHA2OMe **30**), *O,O'*-Dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHA2OBn **32**), *O,O'*-Ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHA2OTHP **27**) und *O,O'*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (BDHA2OTBDMS **28**) im Bereich von pK_a 0-14 mit dem Internetprogramm MarvinSketch Calculator Plug-In berechnet.¹¹⁹ Die Kalkulationen des Programms basieren auf empirisch ermittelte Einflüsse bestimmter Atome, Atomgruppen und Strukturelemente,

welche für die Realisierung von Berechnungen in Parameter überführt wurden. Die erhaltenen Werte wurden mit den entsprechenden Hammett-Konstanten σ (siehe Tabelle 3-1) korreliert, um einen eventuellen Zusammenhang zu erkennen.¹²⁰ Die Geradengleichungen sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

3.1.4.3.3 Ergebnisse

Als ein wesentliches Merkmal war primär festzustellen, dass jede Korrelationsgerade einen negativen Anstieg a besaß. Je größer die Hammett-Konstante σ (siehe Tabelle 3-1), das heißt, je stärker die Elektronendichte des Aromaten durch den Substituenten verringert wurde, desto kleiner wurde der berechnete pK_a -Wert des Stickstoffatoms der Dihydroxyamidingruppe der zugehörigen Verbindung. Für die Protonierung des Stickstoffatoms müsste also bei elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position ein noch kleinerer pH-Wert vorliegen (siehe Formel 2). Bei gleichem pH-Wert würde der Anteil an der protonierten, geladenen Form geringer und das Vorliegen der ungeladenen, lipophilen Form des Moleküls müsste überwiegen.

Tabelle 3-3 Korrelationen der berechneten pK_a -Werte aller synthetisierten BDHAs durch das Programm MarvinSketch mit den Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten.¹¹⁹

Nummer	<i>para</i> -substituierte Verbindungsgruppe	Korrelationsgleichung $pK_a(\sigma) = a\sigma + b$	Korrelationskoeffizient r^2	Anzahl der Verbindungen n
1	<i>pX</i> -BDHA 9 (N)	$pK_a(\sigma) = -1.052\sigma + 2.881$	0.786	7
2	<i>pX</i> -BDHA 9 (O)	$pK_a(\sigma) = -1.254\sigma + 8.747$	0.691	7
3	<i>pX</i> -BDHAOMe 31/31'	$pK_a(\sigma) = -0.736\sigma + 4.280$	0.936	5
4	<i>pX</i> -BDHAOBn 10/10'	$pK_a(\sigma) = -0.741\sigma + 4.216$	0.944	5
5	<i>pX</i> -BDHA2OMe 30	$pK_a(\sigma) = -1.085\sigma + 4.137$	0.862	6
6	<i>pX</i> -BDHA2OBn 32	$pK_a(\sigma) = -1.024\sigma + 3.976$	0.872	7
7	<i>pX</i> -BDHA2OTHP 27	$pK_a(\sigma) = -1.177\sigma + 3.579$	0.883	8
8	<i>pX</i> -BDHA2OTBDMS 28	$pK_a(\sigma) = -1.584\sigma + 4.720$	0.973	4

Auffällig war, dass der pK_a -Wert der *O*-monosubstituierten Verbindungen **31/31'**, **10/10'** weniger empfindlich auf die Veränderung des *para*-Substituenten reagierte (siehe Tabelle 3-3, Nummer 3 und 4). Die Korrelationskoeffizienten r^2 lagen fast alle im Bereich von 0.8-1, woraus geschlossen werden konnte, dass es einen Zusammenhang zwischen dem *para*-Substituenten X und dem pK_a -Wert gab. Die schlechtesten Korrelationen gab es für das *O*-unsubstituierte *pX*-BDHA **9** – hier sind die linearen Zusammenhänge also am wenigsten eindeutig (siehe Tabelle 3-3, Nummer 1 und 2). Es war die einzige Verbindungsgruppe, bei der das Programm MarvinSketch einen weiteren pK_a -Wert innerhalb von pH 0-14 am Sauerstoffatom durch Deprotonierung im Basischen berechnete (siehe Tabelle 3-3, Nummer 2). Ein Zusammenhang mit den Hammett-Konstanten σ wurde hier mit einem Korrelationskoeffizienten r^2 von unter 0.7 allerdings noch weniger deutlich (siehe Tabelle 3-1). Dennoch erkennt man in Abbildung 3-9, dass eine Korrelation zwischen den Hammett-Konstanten σ und den pK_a -Werten besteht. Die linearen Regressionen für alle anderen Verbindungen aus Tabelle 3-3 sehen folglich noch überzeugender aus, wie aus den entsprechenden Korrelationskoeffizienten zu entnehmen ist.

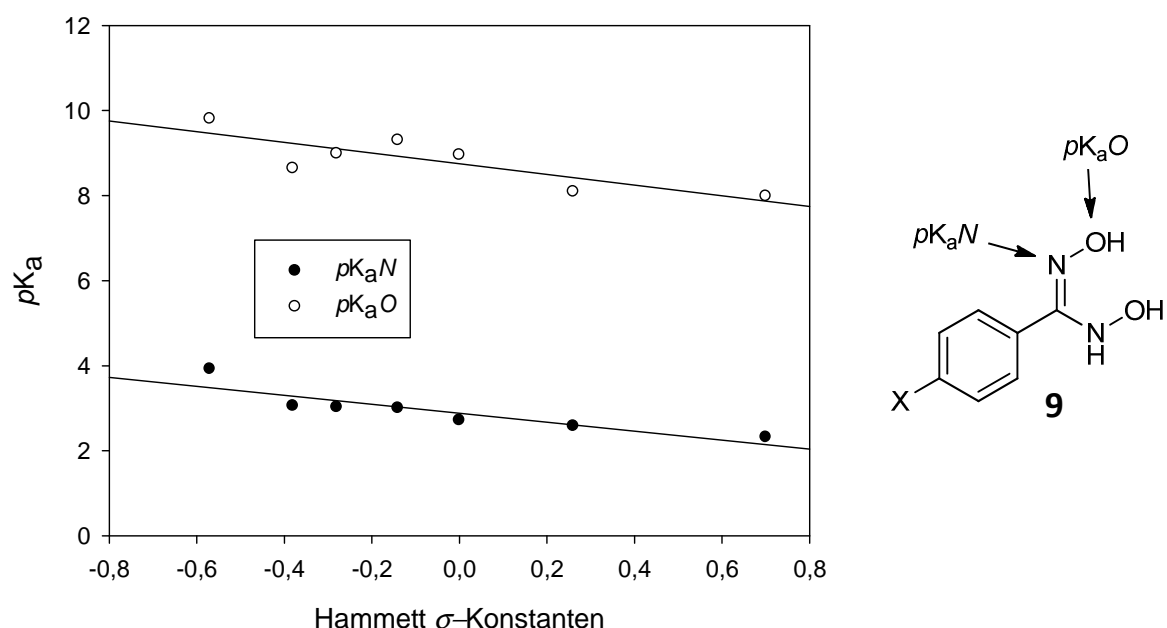


Abbildung 3-9 Regressionsgeraden der beiden berechneten pK_a -Werte von BDHA 9 (siehe Tabelle 3-3, Nummer 1 und 2).

Der y-Achsenabschnitt der Korrelationsgleichungen gibt den mit der Geradengleichung berechneten pK_a -Wert der p -unsubstituierten Verbindung mit $\sigma = 0$ an. Bei pX -BDHA 9 lag der pK_a -Wert deutlich im sauren Bereich von unter pH 3. Im Basischen bei einem pH-Wert über 8.7 käme es nach der Berechnung allerdings ebenfalls zur Ladung der Moleküle, wodurch die Lipophilie deutlich verringert sein würde. Unter physiologischen Bedingungen lägen dennoch alle *para*-substituierten BDHAs 9 ungeladen vor und könnten Membranen durchdringen (siehe Abbildung 3-9). Eine weitere Ausnahme stellten Verbindungen mit protonierbaren oder deprotonierbaren *para*-Substituenten dar, also *para*-Amino- und *para*-Hydroxy- N,N' -dihydroxybenzamidine 9a,b. Die *para*-Amino-Funktion war mit einem pK_a -Wert von unter 3 jeweils schwerer protonierbar als das doppelt gebundene Dihydroxyamidin-Stickstoffatom und besäße somit eine untergeordnete Bedeutung. Auch die Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe des pOH -BDHA 9b bei einem pH-Wert von etwa 10 wäre nicht ausschlaggebend für die Ladung des Moleküls, da bereits ab einem pH-Wert von etwa 9 die Dihydroxyamidin-Funktion deprotoniert würde. Im Gegensatz dazu besäße die Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe der O -substituierten *para*-Hydroxy-Derivate im leicht alkalischen Milieu des pH-Wertes 8.5 eine praktische Bedeutung, da keine Deprotonierung der OH-Gruppen der Dihydroxyamidinfunktionen von 10/10' im Alkalischen berechnet wurde und die O,O -disubstituierten Derivate 32, 27 und 28 an dieser Position nicht deprotonierbar waren.

Der für eine Protonierung der Verbindungen nötige pH-Wert näherte sich mit einfacher Substitution der Sauerstoff-Atome dem neutralen Bereich an (siehe Tabelle 3-3, Nummer 3 und 4), verringerte sich aber wieder durch die Substitution beider Sauerstoff-Atome (siehe Tabelle 3-3, Nummer 5 und 6). Für alle O -substituierten Verbindungen wurde berechnet, dass im pH-Bereich von etwa 4.5-14 keine Ladung der Moleküle auftreten würde, die Substanzen also in der nicht ionischen Form vorlägen.

Da von den cyclischen N,N' -Dihydroxybenzamidinen 13d,i,k keine *para*-derivatisierten Verbindungen hergestellt wurden, ist von den Substanzen keine Korrelationsgerade aufgeführt. MarvinSketch

berechnete für die Verbindungen, dass eine Deprotonierung des Sauerstoffatoms bei einem pH-Wert ab 13.86, also erst im sehr stark Basischen aufträte, hingegen eine Protonierung des Stickstoffs im Säuren, wie sie bei allen anderen Derivaten bestimmt wurde, nicht auftreten würde.

Da es sich bei dieser Betrachtung nur um berechnete Werte handelt, müssen die Ergebnisse kritisch beurteilt werden. Eine gewisse Abweichung der berechneten pK_a -Werte von den wahren Werten ist wahrscheinlich. Dennoch geben die Daten eine glaubhafte Tendenz der Einflüsse der *para*-Substituenten sowie der *O*-Substituenten auf die pK_a -Werte an.

3.1.4.4 Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte

3.1.4.4.1 Einleitung

Die Lipophilie hat einen entscheidenden Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit einer Verbindung. Während lipophile Eigenschaften für die passive Diffusion durch Biomembranen von Vorteil sind, behindert die oft schlechte Löslichkeit lipophiler Verbindungen eine gute Resorption und macht sie von der (sehr langsamen) Lösungsgeschwindigkeit abhängig (siehe Tabelle 1-1).¹²¹ Zur Bestimmung der Lipophilie hat sich der $\log P$ -Wert, der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, etabliert, welcher sowohl berechnet als auch experimentell bestimmt werden kann. Er beschreibt den Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses einer Verbindung in einem Zweiphasensystem bestehend aus 1-Oktanol und Wasser (siehe Formel 4).¹²²

Formel 4 $\log P$ -Verteilungskoeffizient; $c(S)$ = Konzentration der Substanz.

$$\log P = \log \frac{c(S) \text{ in Oktanol}}{c(S) \text{ in Wasser}}$$

Für ionisierbare Moleküle wird der $\log D$ -Wert anstelle des $\log P$ -Wertes angegeben, der *per definitionem* alle ionischen Spezies einer Verbindung mit einbezieht. Hierfür wird der Logarithmus des Verhältnisses der Konzentrationen aller ionischen Formen der Substanz in Oktanol bzw. in Wasser angegeben. Die Konzentration einer bestimmten Spezies der Verbindung und deren Verteilung in den beiden Phasen ist sehr stark vom pH-Wert abhängig, weswegen der $\log D$ -Wert je nach pH-Wert unterschiedlich ist. Die Lipophilie unter physiologischen Bedingungen wurde durch die Berechnung des $\log D$ -Wertes bei einem pH-Wert von 7.4 determiniert.

3.1.4.4.2 Durchführung

Für die experimentelle Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten eignen sich flüssigchromatographische Methoden unter Verwendung von Referenzsubstanzen mit bekannten $\log P$ - bzw. $\log D$ -Werten.¹²³ Auf diese Weise wurde auch die Lipophilie einiger *para*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine mittels HPLC-Analytik bestimmt. Dazu wurden Substanzen mit einem bekannten $\log P$ -Wert als Standards zusammen mit einer Versuchsverbindung in die HPLC injiziert. Der jeweilige Quotient k aus der Retentionszeit und der Totzeit wurde mit den bekannten $\log P$ -Werten der Referenzsubstanzen korreliert und der ermittelte Wert k für die zu untersuchende Verbindung in die resultierende Geradengleichung eingesetzt. Das Fließmittel wies einen pH-Wert von 7.4 auf, um die Lipophilie unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen. Genaue Informationen zu den Referenzsubstanzen und zum verwendeten HPLC-System sind in Kapitel 7.4 aufgeführt. Zusätzlich zur experimentellen Bestimmung der $\log D$ -Werte einiger Verbindungen

wurden die $\log D$ -Werte eben dieser Substanzen mit dem Internetprogramm MarvinSketch berechnet.¹¹⁹

3.1.4.4.3 Ergebnisse

Die erhaltenen experimentellen Daten wurden mit den durch das Programm MarvinSketch berechneten $\log D$ -Werten verglichen (siehe Tabelle 3-4).¹¹⁹ Auf den ersten Blick war zu erkennen, dass sich die absoluten Werte der einzelnen Substanzgruppen BDHA **9**, BDHA2OMe **30**, BDHA2OBn **32** und BDHA2OTHP **27** ähnelten. Die Lipophilie stieg in der erwähnten Reihenfolge bis zu den benzylierten Verbindungen **32** sowohl experimentell als auch berechnet an und fiel bei den tetrahydropyranylierten Substanzen **27** wieder etwas ab. Außerdem wurde der deutlich lipophilisierende Einfluss des *para*-Brom-Substituenten offensichtlich (Tabelle 3-4, Nummer 5), der auch bei dem *para*-Methyl-Rest in schwächerer Ausprägung zu erkennen war (Tabelle 3-4, Nummer 3).

Tabelle 3-4 Vergleich experimentell bestimmter und berechneter $\log D$ -Werte einiger synthetisierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine. *pX* = *para*-Substituent; exp. = experimenteller $\log D$ -Wert; ber. = berechneter $\log D$ -Wert; n.b. = nicht bestimmt; - = nicht synthetisiert.

Nummer	<i>pX</i>	BDHA 9		BDHA2OMe 30		BDHA2OBn 32		BDHA2OTHP 27	
		exp.	ber.	exp.	ber.	exp.	ber.	exp.	ber.
1	OH b	0.2	0.62	-	-	4.2	4.82	3.1, 3.2	3.17
2	OMe c	0.5	0.78	2.1	1.55	4.7	5.00	3.8, 3.9	3.35
3	Me d	0.2	1.46	2.5	2.22	4.9	5.67	4.0, 4.1	4.02
4	H e	0.3	0.94	1.8	1.71	4.5	5.16	3.7, 3.8	3.51
5	Br f	1.0	1.64	3.3	2.48	5.1	5.93	4.1, 4.2	4.28
6	CN g	0.3	0.71	1.9	1.56	4.5	5.01	3.3, 3.5	3.37
7	NO ₂ h	-	-	-	-	4.7	3.88	n.b.	n.b.
8	BDHAAce 13d					1.4	1.84		
9	BDHACypent 13i					2.8	2.42		
10	BDHACyhex 13k					1.3	2.86		

Eine Verringerung der Lipophilie wurde durch einen *para*-Hydroxy-Substituenten sowohl berechnet als auch experimentell bestimmt (Tabelle 3-4, Nummer 1), während der Cyano-Substituent nahezu keinen Effekt auf den Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten gegenüber einem Wasserstoff-Atom zu besitzen schien (Tabelle 3-4, Nummer 6). Generell waren die Abweichungen zwischen den berechneten und bestimmten $\log D$ -Werten bei hydrophilen Verbindungen, also besonders bei den Dihydroxybenzamidinen **9**, größer. Offensichtlich war die Bestimmungsmethode besser für lipophile Substanzen geeignet. Für die tetrahydropyranylierten Verbindungen **27** konnten empirisch jeweils zwei $\log D$ -Werte ermittelt werden, da die Diastereomere HPLC-chromatographisch trennbar waren. Obwohl die Berechnungen jeweils nur einen Wert ergaben, waren die bestimmten und berechneten Lipophilien hier nahezu identisch. Die experimentellen Untersuchungen der Einflüsse des *para*-Methoxy- und des *para*-Nitro-Restes auf die Lipophilie lieferten andere Ergebnisse als die berechneten Daten: Tatsächlich lösten sich die Verbindungen (Tabelle 3-4, Nummer 2 und 7) verhältnismäßig besser in Oktanol als in Wasser im Vergleich zu den *para*-unsubstituierten Verbindungen (Tabelle 3-4, Nummer 4), jedoch berechnete das Programm MarvinSketch eine Herabsetzung der Lipophilie der *p*-Methoxy-Verbindungen im Vergleich zu den *p*-unsubstituierten Derivaten. Auch bei den cyclischen Verbindungen **13** waren die experimentellen und berechneten Lipophilien nicht konform: Während der berechnete $\log D$ -Wert mit Zunahme des aliphatischen

Restes wie erwartet anstieg, stellte BDHACypent **13i** sich bei der empirischen Untersuchung als das lipophilste Derivat heraus (Tabelle 3-4, Nummer 8-10). Dieses Ergebnis war nicht zu erklären. In den meisten Fällen stimmten die Tendenzen der experimentell bestimmten und berechneten logD-Werte aber überein. Die Ergebnisse durch das Programm MarvinSketch resultierten aus empirisch ermittelten Parametern von Strukturelementen, welche für Berechnungen jeder beliebigen Verbindung eingesetzt wurden.¹¹⁹ Nicht beachtete Einflüsse würden also nicht mit in die Berechnung einbezogen werden können und gezwungenermaßen zur Abweichung von den wahren Werten führen.

3.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte eine Reihe von *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (**9**) erfolgreich synthetisiert werden. Bekannt und literaturbeschrieben war bisher nur das *p*-unsubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**), während alle anderen synthetisierten Derivate neu sind.^{69,71,91} Dies ist besonders überraschend, da es sich um sehr kleine Moleküle mit einer simplen Struktur handelt. So sind etwa alle entsprechenden *para*-substituierten Amidoxime **14** mit einer sehr ähnlichen Struktur literaturbekannt. Das Erarbeiten einer allgemeinen Syntheseroute, welche auf viele Verbindungen übertragbar ist, verlief somit erfolgreich. Allerdings konnten auch die Grenzen der Übertragbarkeit der etablierten Route aufgezeigt werden: Die Synthese von *para*-Aminobenzhydroxamsäurechloriden (**18a,i-l**) als Vorstufe der entsprechenden Dihydroxyamidine **9a,i-l** gelang weder durch das Standardchlorierungsreagenz NCS **26**, noch durch das neue CBCA **24** aus den Oximen **17a,i-l**, weswegen alle *para*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidine (**9a,i-l**) auf diese Weise nicht herstellbar waren.^{98,101} Dennoch konnte *para*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) über ein geeignetes Schutzgruppenkonzept erfolgreich dargestellt werden, was von besonderer Bedeutung ist, da es sich hierbei um das einfachste phenyloge *N,N'*-Dihydroxyguanidin handelt (siehe Abbildung 3-8, Kapitel 3.1.3 und 3.2).

Die Stabilität von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) in wässrigen Medien nimmt mit zunehmendem pH-Wert deutlich ab und ist unter physiologischen Bedingungen eher gering. Die gewonnenen Ergebnisse decken sich weitestgehend mit der im Vorfeld durchgeführten Stabilitätsuntersuchung.⁹¹ Es entsteht vor allem Benzamidoxim (**14e**), was physiologisch als Modell eines Prodrugs des entsprechenden Benzamidins (**15e**) als „Drug-Modell“ die gleiche Funktion wie BDHA **9e** besitzt und ohnehin ein Metabolit der Verbindung ist. Der Vorteil des Einsatzes eines Dihydroxybenzamidins **9e** anstelle des entsprechenden BAO **14e** liegt aber in der Verlängerung des Vorliegens einer lipophilen Verbindung, welche durch passive Diffusion vom Organismus absorbiert werden kann. Als weiteres Folgeprodukt wurde erstmals das Dimer 3,5-Diphenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-4-oxid (**64c**) (Abbildung 3-33) nachgewiesen, dessen physiologische Bedeutung unklar und deswegen noch zu eruieren ist. Der Einfluss des *para*-Substituenten auf die Stabilität in wässrigen Medien wurde nicht weiter untersucht. Allerdings verhalten sich alle *para*-substituierten *N,N'*-Di-hydroxybenzamidine **9** in DMSO stabil.

Die Löslichkeit von BDHA **9e** stellte sich im Sauren bis Neutralen als sehr hoch heraus, was einen positiven Beitrag für eine gute Bioverfügbarkeit leistet. Der Einfluss des *para*-Substituenten auf die Sättigungskonzentration ist durch die Bestimmung der pK_a -Werte abschätzbar und wurde aufgrund dessen nicht näher untersucht. Allerdings wurden alle pK_a -Werte der synthetisierten Verbindungen berechnet.¹¹⁹ Die Ergebnisse zeigen, dass der pK_a -Wert mit steigendem Elektronenzug des Substituenten sinkt, das Stickstoffatom also schwerer protonierbar ist und die Permeabilität

ansteigen würde. Einen bedeutenden Einfluss auf die Löslichkeit im Wässrigen besitzt außerdem die Lipophilie, welche in Form des $\log D$ -Wertes sowohl mit MarvinSketch berechnet als auch flüssigchromatographisch ermittelt wurde. Fast alle getesteten *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**9**) weisen einen $\log D$ -Wert von unter 1 auf, was bedeutet, dass sie sich besser in Wasser als in Oktanol lösen und somit alle sehr gut wasserlöslich sind. Der Brom- sowie der Methyl-Substituent besitzen einen lipophilisierenden Effekt, während die Hydroxyl-Gruppe die Verbindung erwartungsgemäß hydrophilisiert.

Eine Vielzahl an *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen konnte auf klassischem Wege oder über ein geeignetes Schutzgruppenprinzip synthetisiert werden. Die physikochemische Charakterisierung ergab eine sehr gute Löslichkeit und eine hohe Permeabilität der Verbindungen, was sich positiv auf die Bioverfügbarkeit auswirken dürfte. Diese hervorragenden Prodrug-Eigenschaften könnten in Zukunft durch die erarbeiteten Syntheserouten auf eine Vielzahl von Arzneistoffmolekülen übertragen werden.

3.2 Synthese von *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

3.2.1 Einleitung

Die *O*-unsubstituierte Dihydroxyamidinstruktur **9** besitzt den nicht unerheblichen Nachteil der Instabilität in neutralen und basischen wässrigen Medien (siehe Kapitel 3.1.4.1). Aufgrund der sehr guten Prodrug-Eigenschaften der Verbindungsklasse sollten nun weitere *N,N'*-Dihydroxybenzamidine synthetisiert werden, welche eine verbesserte Stabilität im Wässrigen besitzen. Durch die Substitution eines oder beider Sauerstoffe der funktionellen Gruppe könnte dies gelingen (siehe Abbildung 2-1, R^1 und/oder $R^2 \neq H$), was durch anschließende Stabilitätsuntersuchungen herausgefunden werden sollte. *O*-substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine könnten außerdem einen Retard-artigen Effekt durch eine verzögerte Bioaktivierung besitzen, was man bei gezieltem Einsatz zu einem großen Vorteil der Verbindungen machen kann (siehe Abbildung 3-10). Ob und in welchem Ausmaß die Bioaktivierung stattfindet, sollte untersucht werden.

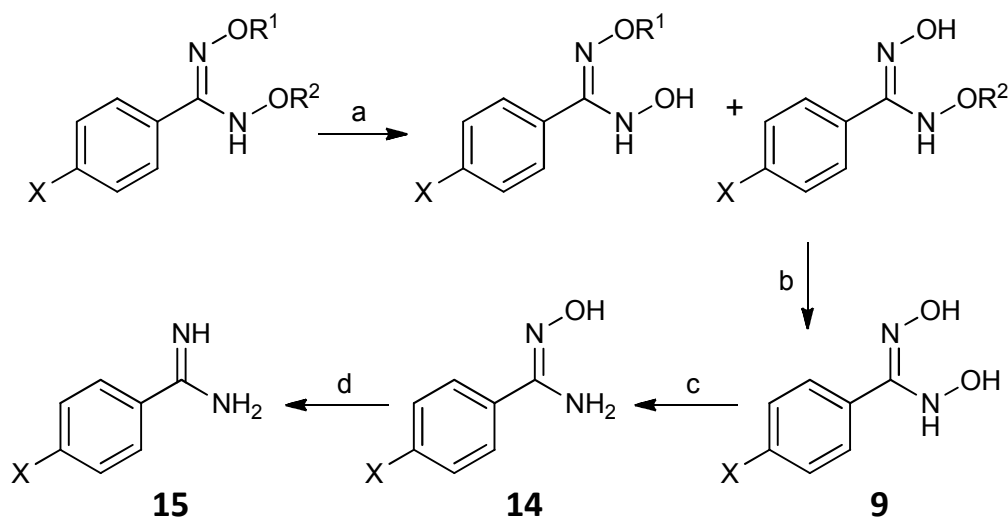


Abbildung 3-10 Eventuell kommt es durch die Substitution von Sauerstoffen zu einem Retard-Effekt, also zu verzögerten Reaktionen a und b. Reaktion c wird schnell enzymatisch (mARC) und nicht enzymatisch vollzogen, Reaktion d geschieht schnell und rein enzymatisch durch mARC.^{69,84}

3.2.2 Synthesestrategien

Für die Herstellung der *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine sollte zunächst genauso vorgegangen werden, wie für die Sauerstoff-unsubstituierten Derivate 9. Durch Reaktion des *para*-substituierten Benzaldehyds 16 mit Hydroxylaminhydrochlorid erhielt man das entsprechende Oxim 17, welches mit NCS 26 zum Hydroxamsäurechlorid 18 reagierte (siehe Kapitel 3.1.2, Abbildung 3-2).^{95,98} Die Hydroxamsäurechloride 18 sollten anschließend mit unterschiedlich substituierten Hydroxylaminen zu *O*-mono- und *O,O'*-disubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen umgesetzt werden. Zunächst konnten bekannte und simpel substituierte Hydroxylamine wie Methyl- und Benzyl-Derivate eingesetzt werden, anhand derer die Synthese und der Effekt des *O*-Substituenten auf die Verbindungen eruierbar wären. Methylether waren bekannt für ihre große Stabilität gegenüber Säuren und Basen, was eventuell einen synthetischen Vorteil aber auch einen metabolischen Nachteil bedeutete, wenn sich die Schutzgruppe nicht schnell und vollständig enzymatisch abspalten ließe.¹²⁴ Ebenso verhielt es sich mit Benzylethern, welche sauren und basischen Bedingungen standhalten würden und durch Hydrogenolyse gespalten werden könnten.^{125,126}

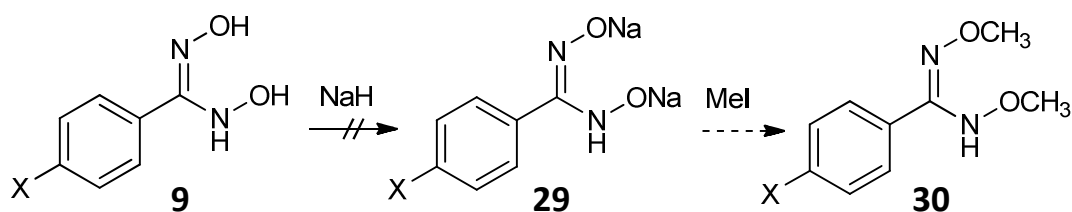


Abbildung 3-11 Die klassische Williamson Ethersynthese zur Darstellung von *O,O'*-disubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen wie zum Beispiel *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30) war nicht möglich, da das einzusetzende Diol 9 sehr basenlabil war und in einem NaH-haltigen Medium sofort zerfiel.¹²⁷

Das Einführen dieser Schutzgruppen erfolgt üblicherweise über eine Variante der Williamson Ethersynthese (siehe Abbildung 3-11), bei der ein Alkohol mit einem Alkylierungsreagenz

(Methyliodid, Dimethylsulfat für die Methylschutzgruppe oder Benzylbromid oder -chlorid für die Benzylschutzgruppe) und einer geeigneten Base (z.B. NaH) zur Herstellung der entsprechenden Metall-Alkoxide **29** reagiert.¹²⁷ Aufgrund der bekannten Instabilität der Dihydroxybenzamidine **9** als die dafür nötigen Ausgangsverbindungen besonders im Basischen war ein alternativer Syntheseweg sinnvoll. Für veränderte erwünschte Eigenschaften der Verbindungen sollten weitere Substituenten eingeführt werden.

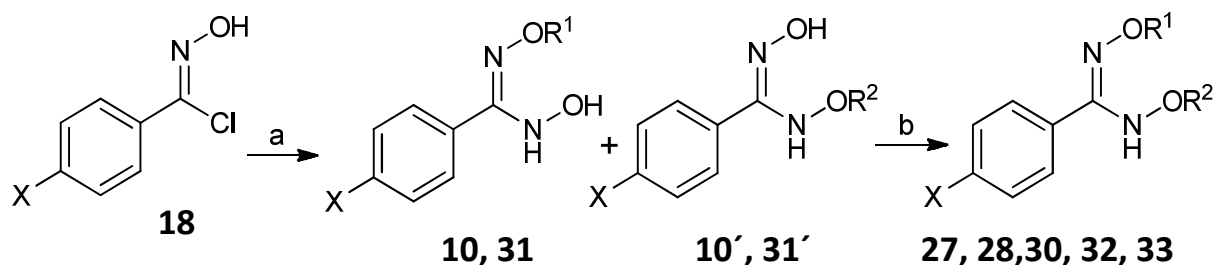


Abbildung 3-12 Synthesepfad für die Darstellung unterschiedlich *O*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine. a und b: entsprechend *O*-substituiertes Hydroxylamin; a: 1-2 eq Reagenz, kürzere Reaktionszeit; b: 2-4 eq Reagenz, längere Reaktionszeit.

Tabelle 3-5 Unterschiedliche *O*-Substituenten der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine und deren Bezeichnung.

Nummer	Substituent R^1/R^2	Bezeichnung der monosubstituierten BDHAs		Bezeichnung der disubstituierten BDHAs
		$R^2 = H$	$R^1 = H$	
1		31	31'	30
2		10	10'	32
3		- ¹	- ¹	27
4		- ¹	- ¹	28
5		- ¹	- ¹	33

Gute Schutzgruppeneigenschaften und eine erhöhte Stabilität im Basischen sollte etwa die unter leicht sauren Bedingungen abspaltbare Tetrahydropyranylschutzgruppe (THP) für Alkohole bieten. Da

¹ Diese Verbindung wurde nicht isoliert und charakterisiert, entstand aber auch bei der Synthese des *O,O'*-disubstituierten Derivates.

Dihydroxybenzamidine **9** besonders im Basischen instabil waren, im Sauren hingegen relativ gute Stabilitätseigenschaften besaßen (siehe Kapitel 3.1.4.1), konnte die Schutzgruppe einen synthetischen Vorteil erbringen.¹²⁸ Ähnlich synthetisch vorteilhafte Eigenschaften boten Silyl etherschutzgruppen an Alkoholen, wie *tert*-Butyldimethylsilyl- oder *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppen (TBDMS, TBDPS). Auch sie waren in basischen Medien stabil, ließen sich unter leicht sauren Bedingungen aber bereits abspalten. Außerdem besaßen sie eine sehr hohe Lipophilie, was in der Synthese durch die resultierenden guten Lösungseigenschaften in organischen Solventien und durch vielfältige Aufreinigungsmöglichkeiten gefragt war.^{129,130}

3.2.3 O-Substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Die Synthese aller *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine verlief, beginnend bei den entsprechenden *para*-substituierten Benzaldehyden **16** bis hin zu den Hydroxamsäurechloriden **18**, wie in Kapitel 3.1.3 bereits ausführlich beschrieben.

3.2.3.1 O-Methylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Zunächst wurde Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) mit jeweils zwei Äquivalenten *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin als Hilfsbase bei 0 °C in Dichlormethan umgesetzt, um *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) zu erhalten (siehe Abbildung 3-12). Der Ansatz wurde mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 2 h wurde ein Produkt erkennbar, welches sich mit Eisen(III)chloridlösung blau verfärbte, aber auch schnell wieder verblasste. Es wurde nach 4 h ein weiteres Äquivalent *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin bei Raumtemperatur zugegeben und weitere 2 Stunden gerührt. Die Aufreinigung mittels Flashchromatographie lieferte ein Produkt, welches im NMR-Spektrum wie ein Gemisch erschien. Im Flüssigchromatogramm der LC-MS-Kopplung ergab die Verbindung aber nur einen Peak, dessen Masse nicht der gesuchten Verbindung **30e** entsprach. Auch auf der DC-Platte schien die Substanz rein zu sein. Nach weiteren NMR-spektroskopischen Untersuchungen stellte sich heraus (siehe Kapitel 4.3), dass es sich bei dem Produkt um ein tautomeres Gemisch monosubstituierter *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine (**31e** und **31'e**, BDHAOMe) im Verhältnis 46:54 handelte (siehe Abbildung 3-13). Die Verbindung war unter den Bedingungen der Flashchromatographie mit Cyclohexan und Ethylacetat über Kieselgel stabil, zersetzte sich allerdings allmählich bei der Elution mit Dichlormethan und Methanol. Da es sich bei **31/31'e** um ein weißes Pulver handelte, wurden Versuche zur Umkristallisation mit Ether, Cyclohexan und Ethylacetat/Petrolether in Anlehnung an Ley *et al.* [1914] unternommen,⁷⁶ allerdings löste sich die Verbindung entweder in allen Lösungsmitteln für die Fällung zu gut oder Zersetzungsprodukte verhinderten die Präzipitation. Weiterhin wurde als Nebenprodukt der Umkristallisationsversuche die Zielverbindung *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) detektiert. Um das Derivat **30e** gezielt zu synthetisieren, wurde fortan die doppelte Menge an *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin eingesetzt. Die Reaktion verlief also zukünftig mit vier Äquivalenten Reagenz bei Raumtemperatur und einer erhöhten Reaktionszeit von mindestens einem Tag. Das Produkt **30e** konnte ebenfalls flashchromatographisch über Kieselgel mit Cyclohexan und Ethylacetat isoliert werden. Die Stabilität in unterschiedlichsten Lösungsmitteln erwies sich während der Synthese und während des NMR-Experiments als deutlich erhöht gegenüber der des monosubstituierten Derivats **31/31'e**.

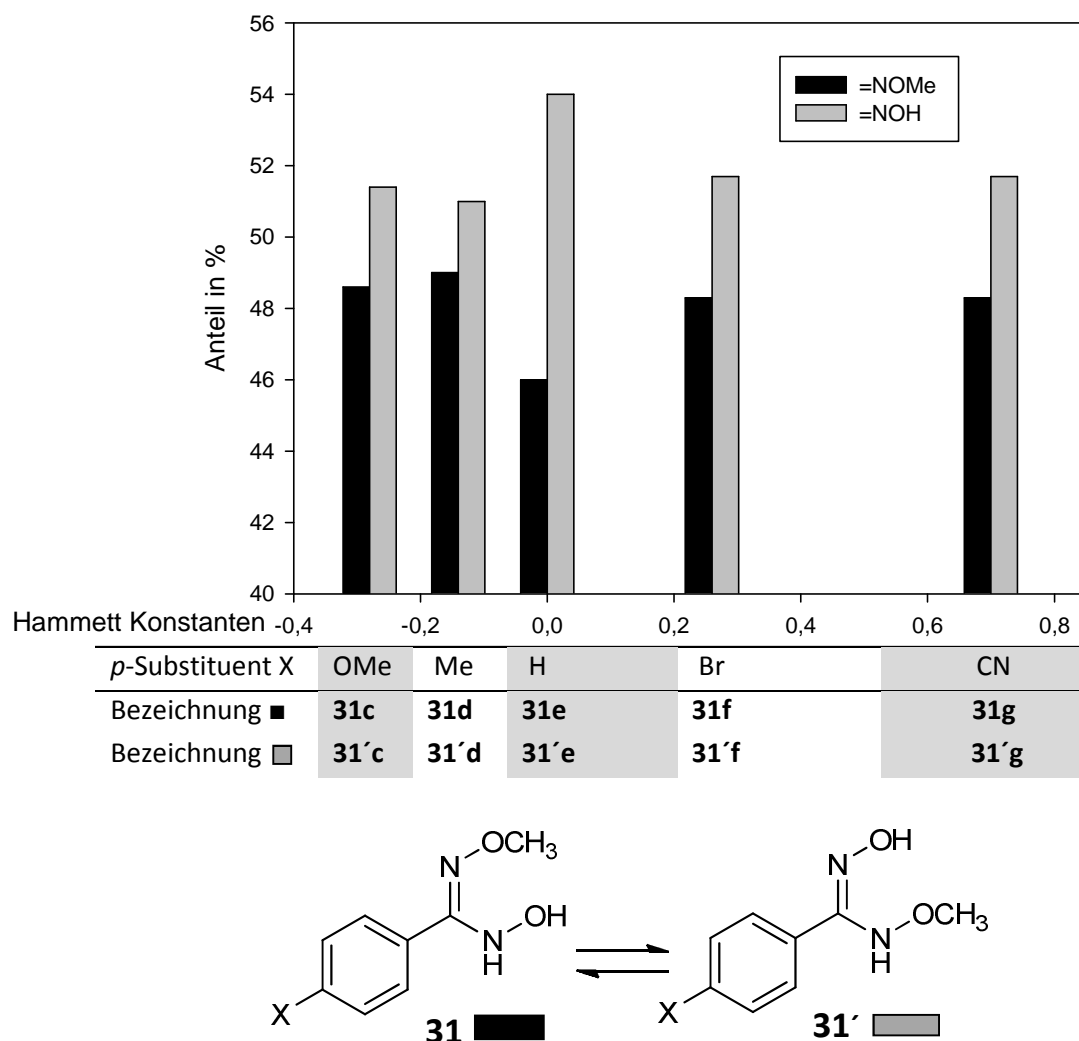


Abbildung 3-13 Bei der Synthese von *para*-substituierten *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen (31) entstanden zwei tautomere Formen 31 und 31', von denen laut NMR-Spektrum in DMSO-*d*₆ 31' bevorzugt vorlag.

Die *p*-Methoxy-, *p*-Methyl-, *p*-Brom- und *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechloride (**18c,d,f,g**) konnten auf die gleiche Weise in DCM mit zwei Äquivalenten *O*-Methylhydroxylamin und Triethylamin zum monosubstituierten Tautomerengemisch **31/31'c,d,f,g** umgesetzt werden. Die Aufreinigung gelang auch hier mittels Flashchromatographie und einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gradienten von 0-30 % des elutroperen Anteils. Das *p*-Methoxy-Derivat **31/31'c** wurde anschließend zusätzlich mit Cyclohexan angerieben und lösliche Verunreinigungen abgesaugt. Das gleiche Prinzip führte bei *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'g**) nacheinander mit Dichlormethan und Cyclohexan zu einem reineren pulverförmigen Produkt. Auffällig war, dass, unabhängig vom Substituenten in *para*-Position, bevorzugt das Tautomer mit freiem Oxim-Sauerstoffatom **31'** vorlag (siehe Abbildung 3-13). Durch längere Reaktionszeiten und der doppelten Menge des Reagenzgemesches aus *O*-Methylhydroxylamin und Triethylamin konnten aus den Hydroxamsäurechloriden **18c,d,f,g** analog zum *para*-unsubstituierten Derivat **18e** auch die *O,O'*-dimethylierten Produkte (**30c,d,f,g**) nach flashchromatographischer Aufreinigung gewonnen werden.

Auf gleiche Weise wurde versucht, *para*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) mit *O*-Methylhydroxylamin und Triethylamin in Dichlormethan umzusetzen. Leider konnten die gesuchten Verbindungen **31/31'h**, **30h** nicht isoliert werden. Das Verfolgen des Reaktionsfortschritts auf der DC-Platte zeigte bereits einen Unterschied zu den Umsetzungen aller anderen Derivate, da das durch Eisen(III)chloridlösung sonst blau verfärbte und gut erkennbare *p*NO₂-BDHAOMe **31h** nicht erschien. Die Analytik mittels NMR-Spektroskopie und MS nach Flashchromatographie des Produktgemisches ergab die Bildung von *p*-Nitro-*O*-methylbenzaldoxim und *p*NO₂-BOx **17h**. Längere Reaktionszeiten und die Erhöhung des eingesetzten Reagenzes konnten folglich auch nicht zu dem *O,O'*-dimethylierten Derivat **30h** führen.

Tabelle 3-6 Reaktionsversuche zur Darstellung von *p*-Hydroxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'b**) aus *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid/TEA. Trotz der Variation der Lösungsmittel und Reaktionszeiten konnte das Produkt **31/31'b** nicht nachgewiesen werden.

Nummer	Lösungsmittel (Reaktionszeit)	Beobachtung	Resultat
1	DCM (2 d)	<ul style="list-style-type: none"><i>p</i>OH-BOxCl 18b war unlöslich	<i>p</i> OH-BDHAOMe 31/31'b nicht mit 2 % aq. FeCl ₃ - Lsg. nachweisbar
2	DCM/Et ₂ O (2 d)	<ul style="list-style-type: none"><i>p</i>OH-BOxCl 18b bildete eine feine SuspensionMethylhydroxylamin-HCl/TEA wurde in Ethanol vorgelöst	
3	Et ₂ O (2 d)	<ul style="list-style-type: none"><i>p</i>OH-BOxCl 18b bildete eine klare LösungMethylhydroxylamin-HCl/TEA wurde in Ethanol vorgelöst	
4	Et ₂ O (4 d)		

Außerdem wurde versucht, *p*OH-BOxCl **18b** umzusetzen. Dazu wurden unterschiedliche Versuche unternommen, welche in Tabelle 3-6 zusammengefasst sind. *p*OH-BDHAOMe **31b** konnte nicht synthetisiert werden. Die Isolierung der Reaktionsprodukte ergab die Bildung von *p*-Hydroxy-*O*-methylbenzaldoxim neben vielen weiteren Produkten. In der Massenspektrometrie konnte die gesuchte Verbindung *p*-Hydroxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31b**) ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Ebenso entstand kein *p*OH-BDHA2OMe (**30b**) durch längere Reaktionszeit und der doppelten Menge an Reagenz.

Die Darstellung von *p*-Amino-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31a**) und *p*-Amino-*O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30a**) war auf diesem Syntheseweg nicht möglich, da das entsprechende Hydroxamsäurechlorid **18a** als Ausgangsverbindung nicht darstellbar war (siehe Kapitel 3.1.3). Die Synthese über einen alternativen Reaktionsweg kam hier ebenfalls nicht in Frage, da dafür die entsprechende *p*-Nitro-Verbindung **31/31'h** bzw. **30h** für die Reduktion zum entsprechenden Amin zugänglich sein müsste.

3.2.3.2 *O*-Benzylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Das *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOBn **10e**) wurde als eines der wenigen literaturbekannten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine bereits im Jahre 1914 von Ley *et al.* beschrieben.⁷⁶ In Anlehnung an die entsprechende Synthesevorschrift wurde das Derivat **10e** aus dem in Ether gelösten BOxCl **18e** und zwei Äquivalenten in Ethanol gelöstem *O*-Benzylhydroxylamin als freie Base

unter Rühren bei Raumtemperatur für 20 h hergestellt. Nach Absaugen und Evaporieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, unlösliche Bestandteile durch Vakuumfiltration entfernt und der Durchgang mit Petrolether bis zur leichten Trübung versetzt. Über Nacht fiel im Kühlschrank das gesuchte Produkt **10e** aus (siehe Abbildung 3-12). Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten auch hier in unterschiedlichen Lösungsmitteln eine Zersetzung von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10e**) an. Die Literatur beschrieb nur eine tautomere Form der Verbindung, das **10'e**, allerdings ergab die NMR-Analyse in DMSO-*d*₆ das Vorliegen von zwei tautomeren Derivaten von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'e**). Überraschenderweise bildete das Verhältnis **10/10'e** nicht die gleiche Tendenz wie **31/31'e**, nämlich ein überwiegendes Vorliegen der Verbindung mit freier Oxim-Funktion (siehe Abbildung 3-13). Stattdessen lag *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'e**) in DMSO-*d*₆ zum größeren Teil das Tautomer **10e** vor, welches eine benzylsubstituierte Oxim-Funktion und ein Hydroxylamin in freier Form besaß (siehe Abbildung 3-14).

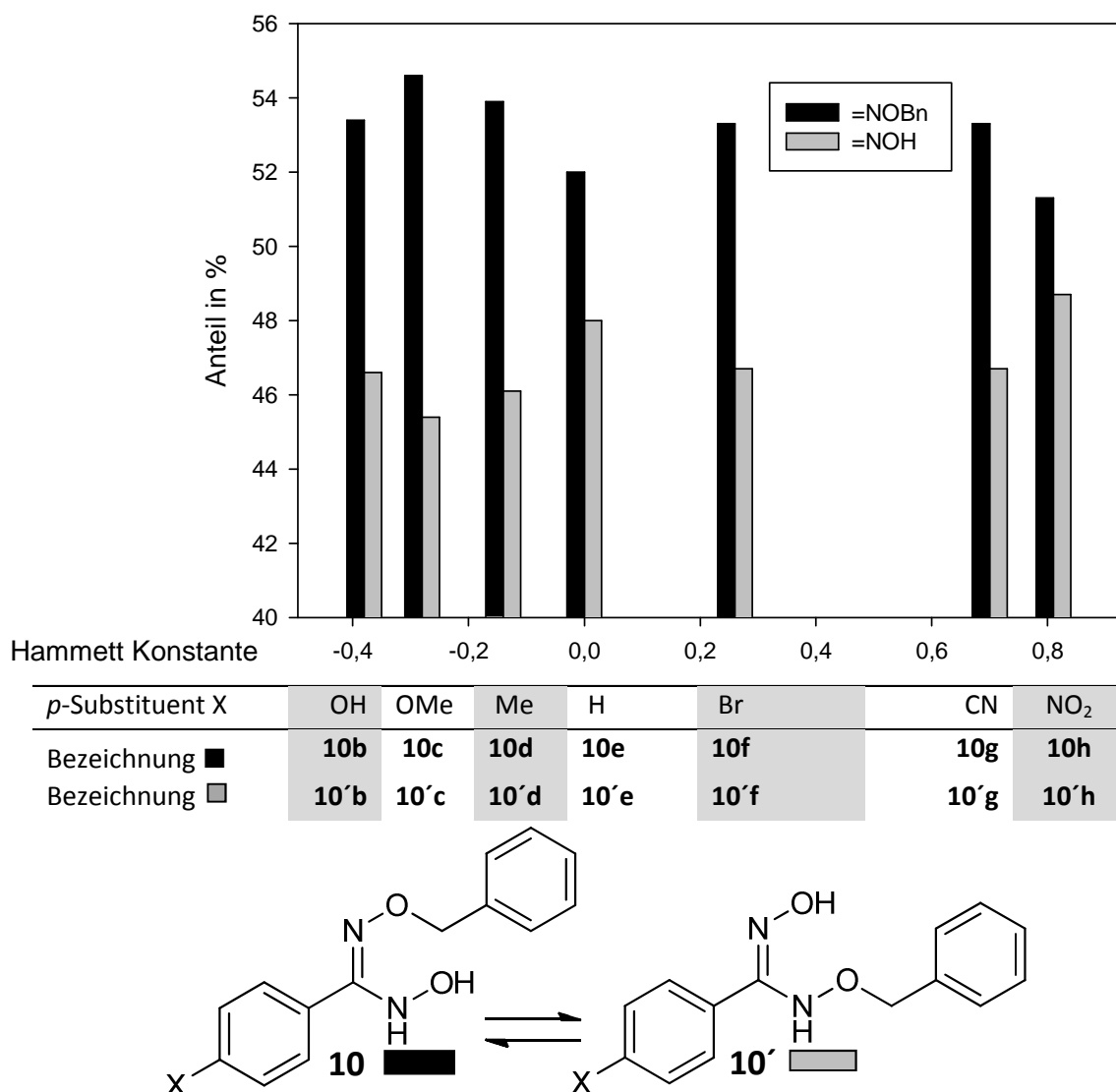


Abbildung 3-14 Die Synthese von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen **10** führte zu jeweils zwei Tautomeren **10** und **10'**, von denen in DMSO-*d*₆ bevorzugt das Derivat mit benzylsubstituiertem Oxim **10** vorlag. Literaturbeschrieben war bisher nur die tautomere Form **10'e**.⁷⁶

Die Umsetzung von *p*-Hydroxy-, *p*-Methoxy-, *p*-Methyl-, *p*-Brom-, *p*-Cyano- und *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18b,c,d,f,g,h**) zu den entsprechenden *O*-benzylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **10/10'b,c,d,f,g,h** gelang ebenfalls mit zwei Äquivalenten Benzylhydroxylamin als freie Base bei Raumtemperatur in Dichlormethan und anschließender Flashchromatographie. Sofort stellte sich bei *p*OH-BDHAOBn **10/10'b** heraus, dass die Verbindung extrem instabil bei Raumtemperatur war. Das gewonnene klare Öl verfärbte sich unter vollständiger Zersetzung über orange zu einer tief schwarzen Paste innerhalb eines Tages. Eine Farbveränderung ließ sich bereits nach wenigen Minuten feststellen. Auch bei -18 °C war der Zerfall nur verzögert und konnte nicht völlig aufgehalten werden. *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'c**) konnte durch Versetzen einer konzentrierten Lösung der Verbindung in Ethylacetat mit Cyclohexan gefällt werden. Die Reinheit von *p*Me-BDHAOBn **10/10'd** wurde durch Fällung der in wenig Ethylacetat gelösten Verbindung mit Petrolether analog zur *p*-unsubstituierten Verbindung **10/10'e** erhöht. Im Falle von *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'f**) genügte das Anreiben des mittels Flashchromatographie

vorgereinigten Produktes mit Cyclohexan und anschließender Entfernung löslicher Verunreinigungen mittels Filtration. Auf gleiche Weise nur mit Dichlormethan als Lösungsmittel gelang die Reinheits-erhöhung des monobenzilylierten *p*-Nitro-Derivats **10/10'h**.

Die entsprechenden *O,O'*-dibenzilylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **32b,c,d,f,g,h** konnten durch eine verlängerte Reaktionszeit und eine größere Menge an *O*-Benzylhydroxylamin gewonnen werden. Wie bei den *O,O'*-dimethylierten Dihydroxyamidinen **30** zeigten auch die entsprechenden dibenzilylierten Derivate eine erhöhte Stabilität in den dünnschichtchromatographischen Tests.

p-Amino-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'a**) und die disubstituierte Verbindung **32a** konnten nicht synthetisiert werden, da die Ausgangsverbindung *p*NH₂-BOxCl **18a** nicht darstellbar war (siehe Kapitel 3.1.3). Da hier aber die entsprechenden *p*-Nitro-Verbindungen **10/10'h** und **32h** zugänglich waren, wurde die Reduktion zum *p*-Amino-Derivat getestet. Weil sich die zu erhaltene funktionelle Gruppe der monosubstituierten Dihydroxyamidine **10/10'** in dünnschichtchromatographischen Voruntersuchungen als eher instabil herausstellte, sollte nur das stabilere dibenzilylierte *p*-Nitro-*N,N'*-dihydroxybenzamidin **32h** gezielt in *para*-Position reduziert werden.

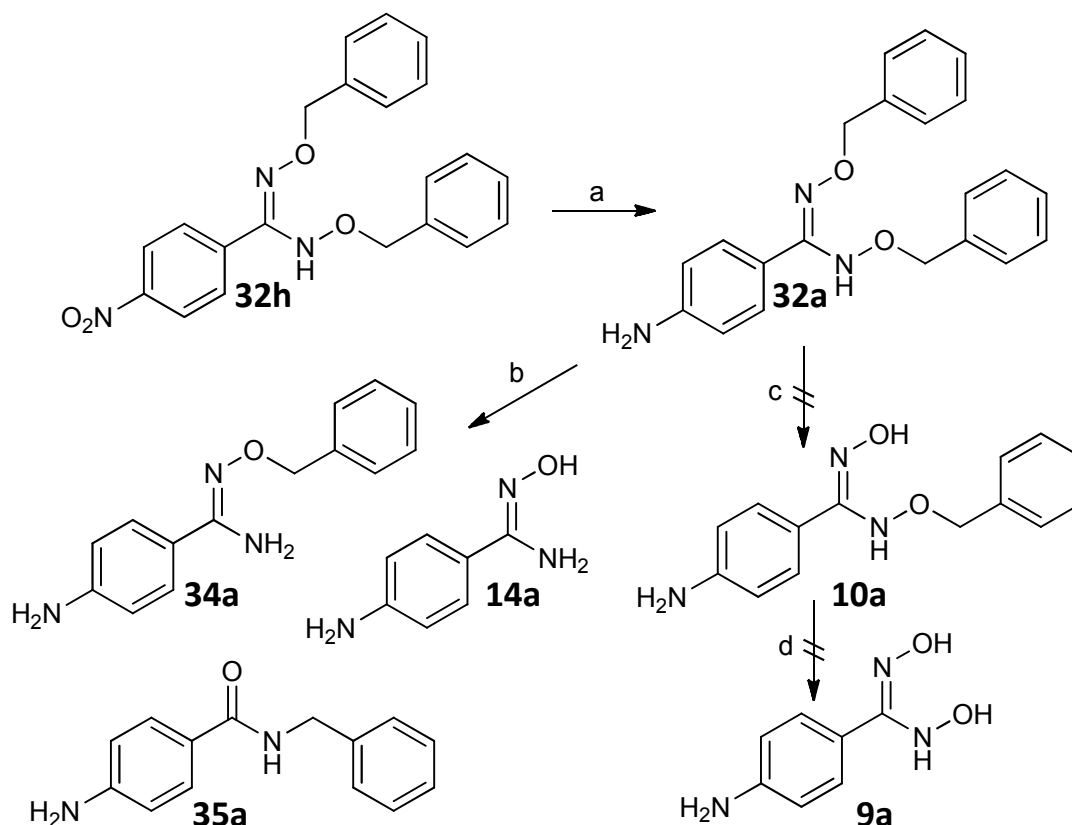


Abbildung 3-15 Die katalytische Hydrierung mit H₂ und Pd/C von *p*-Nitro-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32h**) (a) kann zwar unter sehr milden Bedingungen die Nitrogruppe zu **32a** reduzieren, nicht aber anschließend die Schutzgruppen abspalten (c, d), ohne die Dihydroxy-Funktion aus **10a** oder **9a** zu zerstören (b). a,b,c: H₂, Pd/C, DCM/MeOH, RT, 1 atm.

Benzylschutzgruppen werden durch katalytische Hydrierung abgespalten, weswegen eine Reduktion in *para*-Position und die gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppen zum *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) als Ergebnis angestrebt war (siehe Abbildung 3-15, a, c und d). Der Versuch wurde unter sehr milden Bedingungen durch einen niedrigen Druck und ohne Erhitzen durchgeführt, da die

Gefahr einer zusätzlichen Reduktion der Dihydroxyamidin-Funktion bestand. Tatsächlich entstand durch die Hydrierung in DCM/MeOH mit Palladium/Kohle unter Einleiten von Wasserstoff in die Hydrierapparatur innerhalb von einer Stunde laut Massenspektrometrie die gesuchte Verbindung *p*-Amino-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32a**) neben vielen Produkten, bei denen der Benzylrest zusammen mit dem Sauerstoff abgespalten wurde (*p*-Amino-*O*-benzylbenzamidoxim **34a**, *p*-Aminobenzamidoxim **14a** und *p*-Amino-*N*-benzylbenzamid **35a**). Da die Benzylreste hier als Schutzgruppenkonzept geplant waren und eine Abspaltung im letzten Schritt nötig war, um *p*NH₂-BDHA **9a** zu erhalten, die Hydrierung aber die einzige Möglichkeit der Abspaltung der stabilen Benzylreste ist, wurde dieser Reaktionsweg nicht weiter verfolgt und das *p*NH₂-BDHA2OBn **32a** nicht isoliert. Das theoretische Zwischenprodukt **10a** konnte mittels Massenspektrometrie nicht detektiert werden.

3.2.3.3 *O*-Tetrahydropyranylsubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Da die Tetrahydropyranylsubstitution als Schutzgruppenkonzept angedacht war, wurden nur *O,O'*-disubstituierte Derivate **27** hergestellt. Die Synthese von *O*-monotetrahydropyranylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (BDHAOTHP **36/36'**) erschien aufgrund der erkannten Instabilität anderer *O*-monosubstituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**31/31'**, **10/10'**) wenig sinnvoll. Dennoch konnte man die Verbindung während der Synthesen durch die charakteristische Blaufärbung mit Eisen(III)chloridlösung bei etwa halbem R_F-Wert des entsprechenden *O,O'*-disubstituierten Derivates **27** detektieren (siehe Abbildung 3-16).

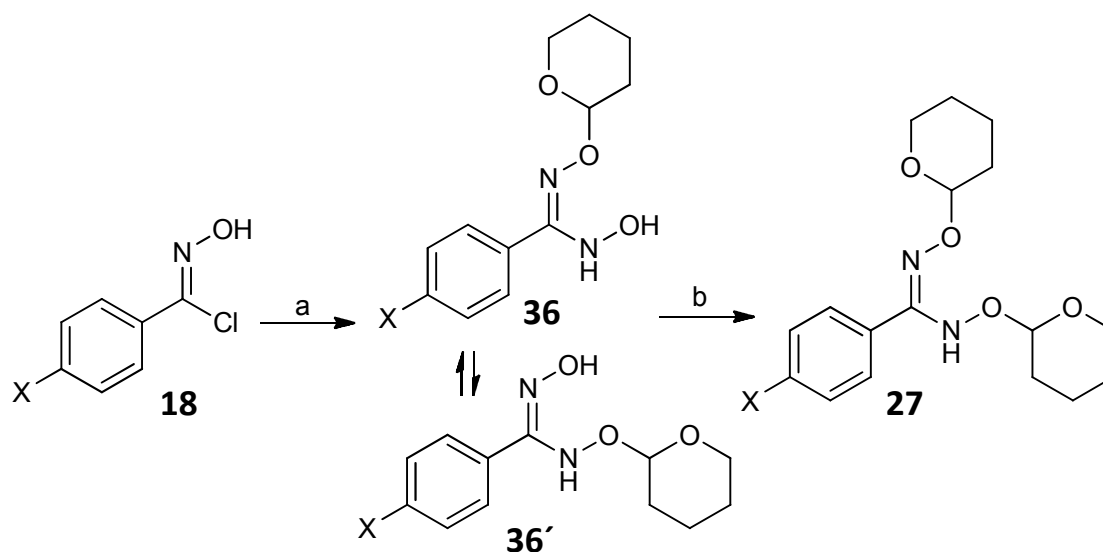


Abbildung 3-16 Bei der Synthese von *O,O'*-ditetrahydropyranylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **27** entstand auch jeweils das monosubstituierte Derivat **36/36'**. Es wurde aber nicht isoliert und charakterisiert, da die Tetrahydropyranylreste aufgrund der Instabilität *O*-monosubstituierter Dihydroxyamidine hier nicht die Funktion einer Schutzgruppe erfüllen würden. a, b: *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin **40** in DCM; b: längere Reaktionszeit.

Für die Synthese aller *O*-tetrahydropyranylierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **27** musste zunächst das Reagenz *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin **40** hergestellt werden (siehe Abbildung 3-17). Dazu wurde nach einer Vorschrift von Haslanger *et al.* [1986] vorgegangen.¹³¹ Dihydropyran **38** und katalytische Mengen an *p*-Tosylsulfonsäure wurden zu einer stark gerührten Lösung aus *N*-Hydroxyphthalimid (**37**) in trockenem Dichlormethan und Dioxan unter Argon gegeben. Die Reaktion wurde durch Natriumhydrogencarbonatlösung nach 2 h abgestoppt und die Phasen getrennt. Nach

Waschen und Trocknen der organischen Phase und Evaporation des Solvens wurde der verbliebene weiße Rückstand mit *n*-Hexan angerieben und lösliche Verunreinigungen abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde verdampft und lieferte reines *O*-Tetrahydropyranyl-*N*-hydroxyphthalimid (**39**) als Zwischenprodukt. Dies wurde mit trockenem Benzol versetzt und nach Zugabe von Methylhydrazin kurzzeitig erhitzt. Nach Verdampfen des Solvens wurde der Rückstand fraktioniert destilliert, um *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) zu erhalten.¹³¹

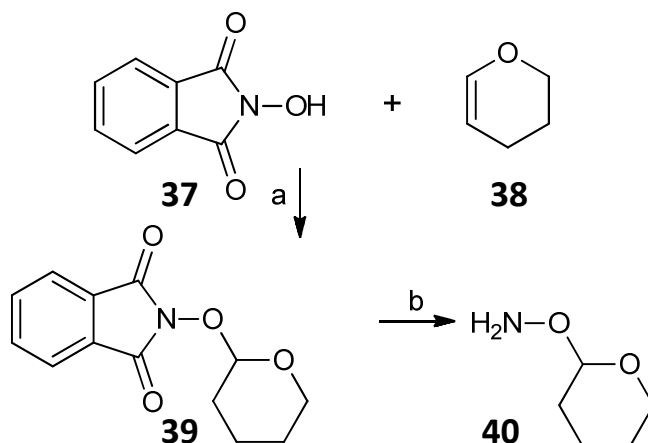
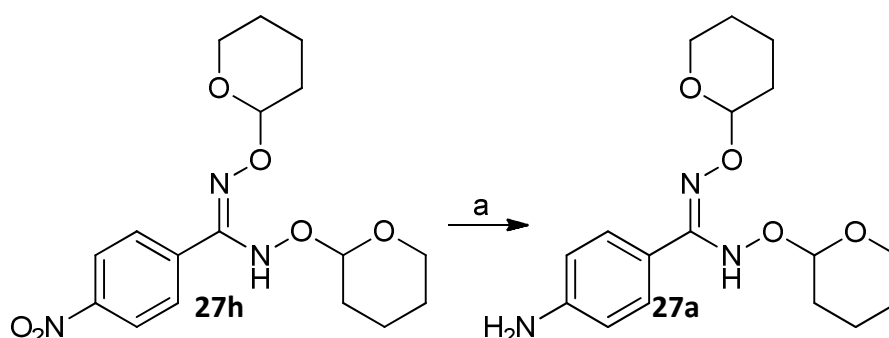


Abbildung 3-17 Synthese von *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) aus *N*-Hydroxyphthalimid (**37**) und Dihydropyran **38** mit *O*-Tetrahydropyranyl-*N*-hydroxyphthalimid (**39**) als Zwischenstufe. a: kat. *p*-Tosylsulfonsäure, DCM, Dioxan, 2 h RT, NaHCO₃; b: Benzol, Methylhydrazin, 15 min 80 °C.

Die Reaktionen wurden ähnlich wie die der Synthese der *O,O'*-dimethylierten und *O,O'*-dibenzylierten *N,N'*-dihydroxybenzamidine (**30**, **32**) durchgeführt. Demnach wurden die entsprechenden *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechloride **18** mit zwei Äquivalenten *O*-THP-Hydroxylamin **40** in Dichlormethan bei Raumtemperatur versetzt (siehe Abbildung 3-16) und das Fortschreiten der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Besprühen mit Eisen(III)chloridlösung erkannte man die monosubstituierten Verbindungen **36** sofort als blaue Spots, während sich die ditetrahydropyranylierten Derivate **27** erst nach Erhitzen durch Blaufärbung zeigten. War nach einem Tag noch Ausgangsverbindung **18** erkennbar, wurden weitere zwei Äquivalente Reagenz **40** hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurde ebenso verfahren. Üblicherweise war die Reaktion nach zwei bis drei Tagen abgeschlossen und das entsprechende Produkt konnte nach Abfiltrieren des hydroxylaminhydrochloridhaltigen Fällungsproduktes flashchromatographisch aufgereinigt werden. Die Verbindungen **27b-f** lagen daraufhin in ausreichender Reinheit vor, während die Purität von *p*-Cyano-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27g**) durch Anreiben mit Dichlormethan und Absaugen löslicher Verunreinigungen verbessert werden konnte. Die Reinheit von *p*-Nitro-BDHA2OTHP **27h** wurde durch Fällung in Diethylether erhöht.

p-Amino-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) konnte nicht auf dem klassischen Syntheseweg hergestellt werden, da das entsprechende Benzhydroxamsäurechlorid **18a** nicht darstellbar war (siehe Kapitel 3.1.3). Erfolgreich war aber die Darstellung der Verbindung **27a** über einen Umweg aus dem *p*-Nitro-Derivat **27h** durch Reduktion (siehe Abbildung 3-8). Dafür wurden verschiedene Hydrierungsversuche unternommen (siehe Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7 Verschiedene Reduktionsversuche a von *p*-Nitro-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27h**) zur Synthese des entsprechenden *p*-Amino-Derivates **27a**.



Nummer	Reduktionsmittel und Bedingungen (a)			Produkte
1	H_2 , Pd/C, DCM/MeOH, RT, 2.5 bar Cyclohexen, Pd/C, MeOH, Mikrowelle Zeit Temperatur Cyclohexen			<i>p</i> - NH_2BA 15a
2	2 min	60 °C	5 eq	<i>p</i> - NO_2BAO 14h ,
3	5 min	60 °C	5 eq	<i>p</i> - $\text{NO}_2\text{BDHA2OTHP}$ 27h
4	5 min	70 °C	5 eq	
5	5 min	80 °C	5 eq	<i>p</i> - NO_2BAO 14h , <i>p</i> - $\text{NO}_2\text{BDHAOTHP}$ 36h , <i>p</i> - $\text{NO}_2\text{BDHA2OTHP}$ 27h
6	5 min	80 °C	2.5 eq	<i>p</i> - NH_2BA 15a , <i>p</i> - NH_2BAO 14a , <i>p</i> - NO_2BAO 14h
7	10 eq Natriumdithionit, H_2O /THF			<i>p</i> - $\text{NH}_2\text{BDHA2OTHP}$ 27a

Zunächst wurde die *p*-Nitro-Verbindung **27h** nach der klassischen Reduktionsmethode mit Wasserstoff in der Hydrierapparatur unter 2.5 bar mit Palladium/Kohle als Katalysator und Dichlormethan/Methanol als Lösungsmittel unter ständigem Schütteln umgesetzt. Das einzig detektierbare Produkt *p*-Aminobenzamidin (**15a**) zeigte deutlich, dass die Reaktionsbedingungen zu stark reduktiv wirkten. Zwar wurde die *p*-Nitro-Gruppe erfolgreich zum Amin reduziert, jedoch geschah dies unter vollständigem Verlust der Dihydroxyamidin-Funktion (siehe Tabelle 3-7, Nummer 1). Als beschriebene mildere Reduktionsmethode wurde anschließend die Hydrierung mit Cyclohexen, aus welchem *in situ* Wasserstoff als Reduktionsmittel und Benzol als Nebenprodukt entstand, mit Palladium/Kohle-Katalysator und Methanol als Lösungsmittel in der Mikrowelle in Anlehnung an Johnstone *et al.* [1985] getestet.¹¹² Verschiedenste Variationen der Reaktionszeiten und -temperaturen führten nicht zum gewünschten Produkt **27a**, welches dünnschichtchromatographisch sowohl durch eine positive Reaktion mit Ehrlichs-Reagenz auf primäre aromatische Amine als auch mit Eisen(III)chloridlösung auf *O,O'*-Ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxyamidin-Reste detektiert werden sollte. Es zeigte sich deutlich, dass mit dieser Methode zuerst die substituierte Dihydroxyamidin-Funktion und erst anschließend die *p*-Nitro-Gruppe reduziert wurde und somit auf diesem Wege kein *p*-Amino-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) darzustellen war (siehe Tabelle 3-7, Nummer 2-6). Daraufhin wurde Natriumdithionit als bekanntes mildes Reduktionsmittel getestet, indem 10 Äquivalenten vorgelöst in Wasser langsam zu dem in THF solvatisierten *p*-Nitro-BDHA2OTHP **27h** getropft wurde. Nach wenigen Stunden Rühren bei Raumtemperatur und Hinzufügen von Wasser konnte das

Rohprodukt **27a** mit Dichlormethan extrahiert und mittels Flashchromatographie aufgereinigt werden (siehe Tabelle 3-7, Nummer 7).

3.2.3.4 *O*-*tert*-Butyldimethylsilylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Da die Ausbeute an *p*-Amino-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) als Vorstufe für *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) noch nicht zufriedenstellend war, wurde eine weitere Schutzgruppe getestet, mit der es ebenfalls möglich sein konnte, das *p*-Nitro-Derivat **28h** gezielt unter Bestehen der Schutzgruppen zum *p*-Amino-Derivat **28a** zu reduzieren (siehe Abbildung 3-8). Durch die lipophilen Eigenschaften der *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (TBDMS) würde außerdem die Handhabung während der Synthese erleichtert. Gute Löslichkeitseigenschaften in organischen Solventien ermöglichten zudem eine hohe Purität der Verbindungen. Die Übertragbarkeit der Synthese wurde nur noch anhand weniger Exempel nachgewiesen, da die Synthesemethode bereits an ausreichenden Beispielen, an *O*-methylierten- (**31/31'**, **30**), *O*-benzylierten- (**10/10'**, **32**) und *O*-tetrahydropyranylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (**27**), angewendet wurde. Außerdem wurden auch hier nur *O,O'*-disubstituierte Derivate **28** synthetisiert, da nur für diese das Schutzgruppenkonzept funktioniert. Hingegen erwiesen sich *O*-mono-substituierte Derivate in Vorversuchen an den *O*-methylierten- und *O*-benzylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (**31/31'**, **10/10'**) als instabil.

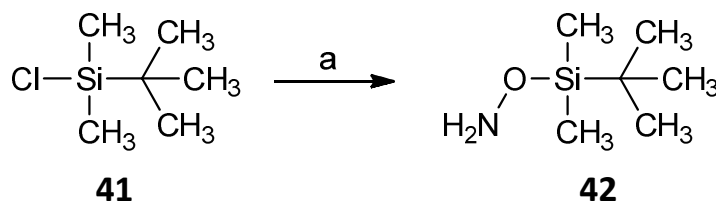


Abbildung 3-18 Synthese des Reagenzes *O*-*tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (TBDMSHA **42**) zur Darstellung von *O,O'*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen **28** ausgehend von *tert*-Butyldimethylchlorsilan (**41**). a: Hydroxylaminhydrochlorid, Ethylendiamin, DCM, RT, 1 d.

Zunächst war es auch hier nötig, das Hydroxylamin-Reagenz **42** herzustellen (siehe Abbildung 3-18). Dafür wurde fein gepulvertes Hydroxylamin zu Ethylendiamin in Dichlormethan gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur unter Ausbildung von zwei Phasen gerührt. Zu dem *in situ* entstandenen Hydroxylamin wurde langsam innerhalb einer Stunde *t*-Butyldimethylchlorsilan (**41**) zugetropft, wobei sich das Lösungsmittel erwärmte und mittels Rückflusskühler kondensiert wurde. Das Gemisch wurde einen Tag bei Raumtemperatur gerührt und das Solvens evaporiert. Durch fraktionierte Destillation konnte das TBDMSHA **42** gewonnen werden.

Das so erhaltene Reagenz **42** wurde mit den Benzhydroxamsäurechloriden **18b,e** und **h** in Dichlormethan bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 3-19). Auffällig war die benötigte sehr lange Reaktionszeit bei Umgebungstemperatur. Durch die großen Reste und die daraus resultierende sterische Hinderung bildete sich zunächst stark bevorzugt das monosubstituierte Derivat **43/43'b,e,h**, welches sich per dünnschichtchromatographischer Untersuchung mit Eisen(III)chloridlösung relativ schnell blau verfärbte. Die Disubstitution zu **28b,e** und **h** trat erst nach etwa drei Tagen ein und konnte durch Besprühen mit Eisen(III)chloridlösung und anschließend etwa einstündigem Warten als blau erscheinende Spots auf der DC-Platte erkannt werden. Eine Reaktionszeit von etwa zehn Tagen war üblich, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit von **18b** über **18e** zu **18h** zunahm.

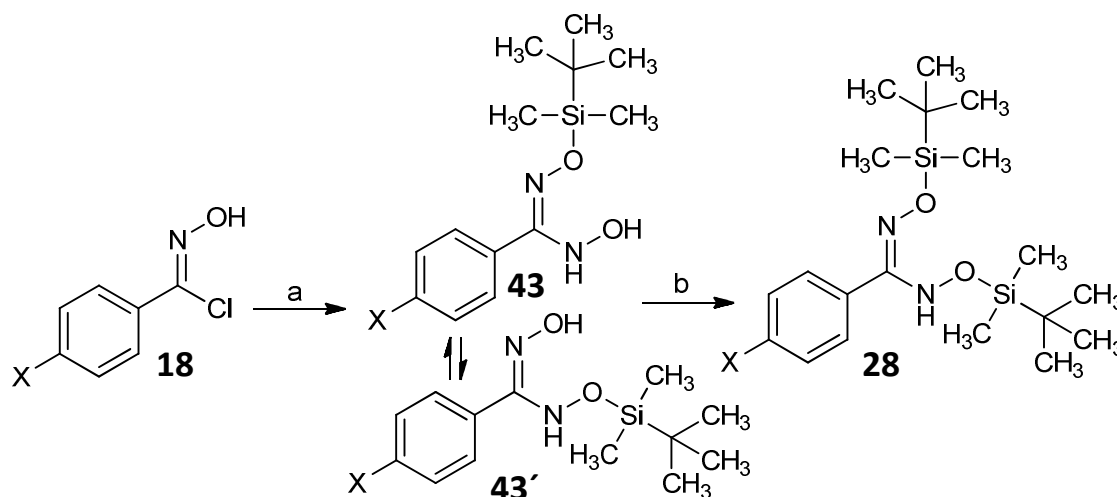


Abbildung 3-19 Bei der Synthese von den *O,O'*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen **28b,e** und **h** entstanden durch die sterische Hinderung der großen Substituenten bevorzugt die monosubstituierten *O-tert*-Butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine **43/43'**, **e** und **h**. Eine deutlich erhöhte Reaktionszeit verlief zugunsten der Disubstitution zu **28b,e** und **h**. a und b: *O-tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (**42**), DCM, RT; b: längere Reaktionszeit von bis zu 10 d.

Da das *p*-Aminobenzhydroxamsäurechlorid (**18a**) synthetisch nicht zugänglich war (siehe Kapitel 3.1.3), konnte diese Syntheseroute nicht auf die Darstellung von *p*-Amino-BDHA2OTBDMS **28a** angewendet werden. Stattdessen wurde das entsprechende *p*-Nitro-Derivat **28h** in THF gelöst und mit Natriumdithionit in Wasser reduziert (siehe Abbildung 3-8). Andere Reduktionsmethoden wurden für diese Reaktion nicht getestet, da weitere verschiedene Hydrierungsversuche mit *p*-Nitro-*O,O'*-ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27h**) durchgeführt wurden und alle nicht zum Erfolg führten. Die einzig erfolgreiche Reduktionsmethode des *O,O'*-ditetrahydropyranylierten Derivats **27h** wurde folglich auf die analoge Verbindung mit TBDMS-Schutzgruppen **28h** übertragen und verlief mit knappen 25 % in besseren Ausbeuten als die entsprechende Reduktion von **27h** mit nur etwa 17 %. Auf diese Weise konnte *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) erfolgreich und in guten Ausbeuten synthetisiert werden.

3.2.3.5 *O-tert*-Butyldiphenylsilylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Da die TBDMS-Schutzgruppe nicht stabil gegenüber Säuren war, saure Reaktionsbedingungen aber zum Beispiel für Diazotierungsreaktionen benötigt wurden, bestand der Bedarf nach einer stabileren Schutzgruppe. Eine ähnliche Struktur wies der *tert*-Butyldiphenylsilylrest (TBDPS) auf, der als säurestabiler im Vergleich zu TBDMS beschrieben wurde, dessen Eigenschaften darüber hinaus aber der bereits eingesetzten Schutzgruppe ähnelten.¹³⁰ Generell sorgen große und sperrige Substituenten am Siliziumatom für eine erhöhte Stabilität gegenüber Säuren und Basen. Weiterhin bieten elektronenziehende Substituenten, wie beispielsweise Phenylreste, eine höhere Beständigkeit der damit geschützten Verbindungen gegenüber Säuren. Die Basenstabilität hingegen würde durch elektronenschiebende Substituenten verbessert.¹³² Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Schutzgruppen konnten die gleichen Abspaltungsreagenzien verwendet werden. Da die Entfernung der TBDMS-Schutzgruppen mit Ammoniumfluorid nur wenige Minuten dauerte (siehe Kapitel 3.1.3), war zu erwarten, dass eine Verlängerung der Reaktionszeit genügen würde, um auch die TBDPS-Gruppe von einem Molekül abzuspalten. Die schnellere und einfachere Synthese des Hydroxylamin-Reagenzes **45** ohne fraktionierte Destillation stellte einen weiteren Vorteil der TBDPS-Schutzgruppe

gegenüber der TBDMS-Funktion dar. Das Hydroxylamin **45** konnte als freie Base aus organischen Lösungsmitteln kristallisiert werden.

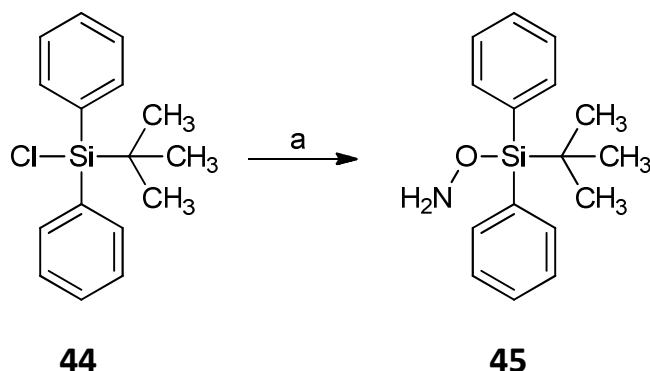


Abbildung 3-20 Die Herstellung des Reagenzes *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin (TBDP SHA **45**) gelang durch eine simple Umsetzung von *tert*-Butyldiphenylchlorosilan (**44**) mit Hydroxylamin und anschließenden Lösungsmittelwechseln ohne die Notwendigkeit einer fraktionierten Destillation. a: Hydroxylaminhydrochlorid, TEA, DCM, RT.

Um zu testen, ob sich durch die *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe verbesserte Reaktionseigenschaften ergeben, musste zunächst das Reagenz **45** hergestellt werden. Dafür wurde nach einer Vorschrift von Stewart *et al.* [1989] vorgegangen.¹³³ Es wurde Hydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin in Dichlormethan mit *tert*-Butyldiphenylchlorosilan (**44**) unter Schutzgas zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung wurde der Rückstand über Nacht in *n*-Hexan kristallisiert und *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin (TBDP SHA **45**) als weißen, kristallinen Feststoff erhalten (siehe Abbildung 3-20).

Da für eine Diazotierungsreaktion nur die *p*-Amino-Verbindung **33a** von Interesse war und die Synthese von *p*-Aminobenzhydroxamsäurechlorid (**18a**) nicht zum Erfolg führte (siehe Kapitel 3.1.3), ging die Darstellung von *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**33a**) vom entsprechenden *p*-Nitro-Derivat **33h** aus (siehe auch Kapitel 3.2.3.3 und 3.2.3.4). Dazu wurde *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) mit TBDP SHA **45** auf gewohnte Weise in Dichlormethan bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionszeit musste durch die noch voluminöseren Reste drastisch erhöht werden, da die sterische Hinderung hier offensichtlich einen deutlich größeren reaktionshemmenden Einfluss besaß als bei der entsprechenden Reaktion mit TBDMSHA **42**. Die Reaktion der *O*-monosubstituierten Derivate **46/46h'** mit weiterem Hydroxylamin **45** gelang nur unvollständig und dauerte bis zu zwei Wochen. Aufgrund dessen wurde, trotz bekannter Instabilität von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen bei höheren Temperaturen, der Reaktionsansatz auf 40 °C unter Rückfluss erhitzt, wodurch sich die Reaktionszeit bei guter Ausbeute an *p*-Nitro-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**33h**) von etwa 65 % auf fünf Tage verringerte.

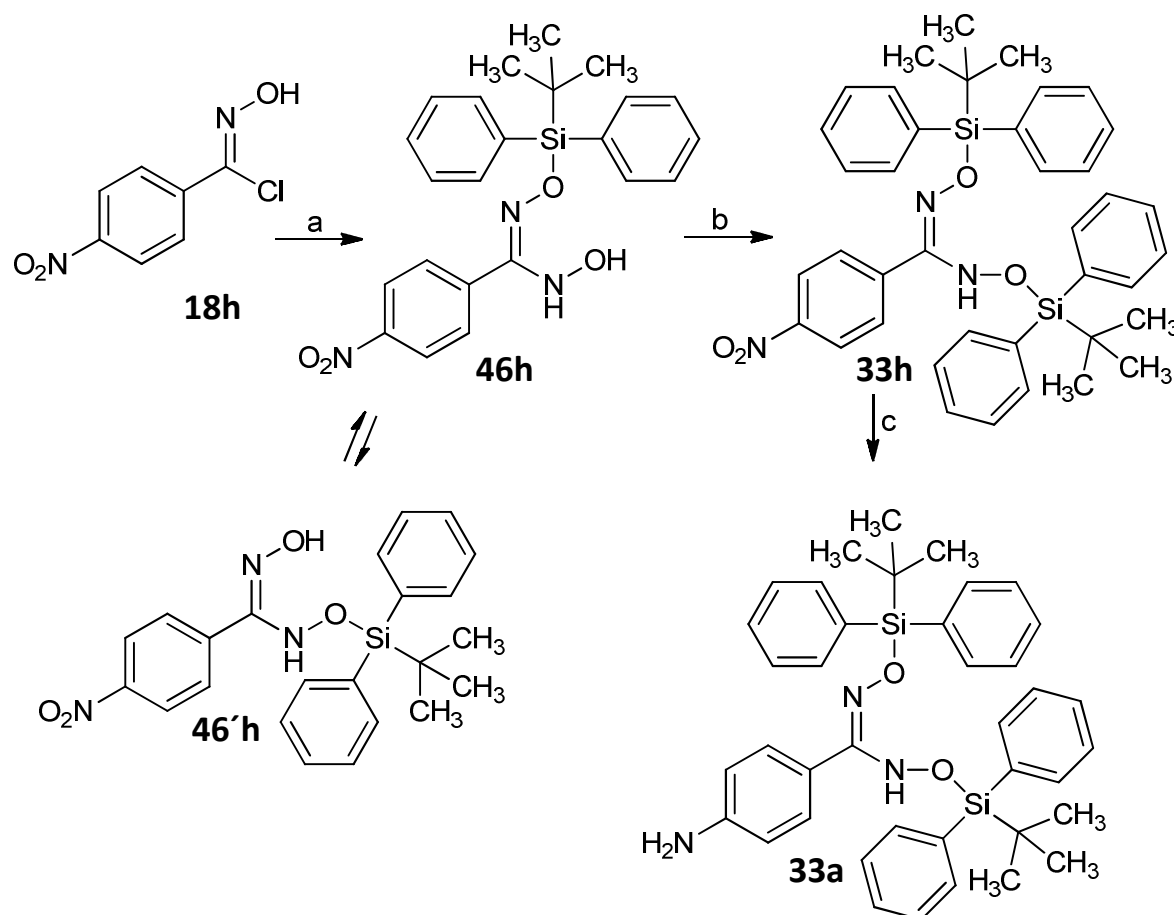


Abbildung 3-21 Synthese von *p*-Nitro- und *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (33h und a). Durch die großen TBDPS-Reste trat bevorzugt die Monosubstitution zu den im tautomeren Gleichgewicht stehenden 46 und 46' (a) ein. Eine Disubstitution (b) war durch leichte Erwärmung erreichbar. Die Reduktion c erfolgte mit Natriumdithionit. a, b: *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin (45), DCM, RT; b: zusätzlich 40-45 °C, rf; c: THF, Natriumdithionit in Wasser, RT.

Die Reduktion von *p*-Nitro-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (33h) zum entsprechenden *p*-Amino-Derivat 33a wurde nach der bewährten Methode in THF mit Natriumdithionit, zuvor gelöst in Wasser, bei Raumtemperatur durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.3.3 und 3.2.3.4). Nach Extraktion mit Ethylacetat und flashchromatographischer Aufreinigung konnte *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (33a) in guten Ausbeuten von knapp 60 % gewonnen werden. Die TBDPS-Schutzgruppe führte also zu deutlich besseren Resultaten bei der Reduktion der entsprechenden Nitro-Verbindung 33h im Gegensatz zur analogen TBDMS-Verbindung 28h.

3.2.3.6 Weitere Versuche der *O*-Substitution von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

Es wurden einige weitere Versuche unternommen, *O,O'*-disubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine herzustellen, um eine erhöhte Stabilität der Verbindungen besonders im Neutralen und Basischen zu erreichen.

Eine sehr verbreitete Möglichkeit zur Protektion von Alkoholfunktionen ist der Schutz mit Trimethylsilyl-Gruppen. Sie bieten den Vorteil, dass sie leicht zu synthetisieren sind, die Reaktionsfähigkeit der Alkoholfunktion blockieren und sich durch die hohe Affinität des Siliziums zum Fluoratom sehr gezielt mit verschiedenen Fluoriden abspalten lassen.¹³² Zum Einführen dieser

Schutzgruppe wurde *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) mit Hexamethyldisilazan (HMDS **47**) und Siliziumdioxid-gestütztem Natriumhydrogensulfat als Katalysator in Acetonitril nach einer Vorschrift von Shaterian *et al.* [2008] für Alkohole und Oxime zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 3-22).¹³⁴ Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach fünf Minuten konnte ein Produkt mit positiv blauer Eisen(III)chloridreaktion mit sehr großem R_f -Wert, wie es für das Produkt zu erwarten war, nachgewiesen werden. Allerdings zersetzte es sich offenbar sehr schnell unter den basischen Bedingungen, denn die DC-Überprüfung nach zwei Stunden zeigte weder Ausgangsstoff **9e** noch Reaktionsprodukt **48e**. Ein weiterer Ansatz ohne Katalysator und mit kürzerer Reaktionszeit, der ebenfalls das mögliche Produkt **48e** per DC anzeigte, wurde zur weiteren Analyse mittels Flashchromatographie aufgetrennt. Leider konnte die gesuchte Verbindung **48e** aber nicht nachgewiesen werden. Falls diese vorlag, war *O,O'*-Bis(trimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**48e**) sehr instabil und zersetzte sich während der Synthese oder Chromatographie. Wahrscheinlicher aber war, dass die bekanntlich labilere *O*-monosubstituierte Verbindung *O*-Trimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin in geringen Mengen entstand und im basischen Reaktionsmedium zerfiel. Die bekannte Labilität kleiner Silylschutzgruppen, zu denen die TMS-Gruppe gehörte, gegenüber chromatographischen Methoden schien auch durch die schnelle Flashchromatographie nicht zu umgehen zu sein.¹³²

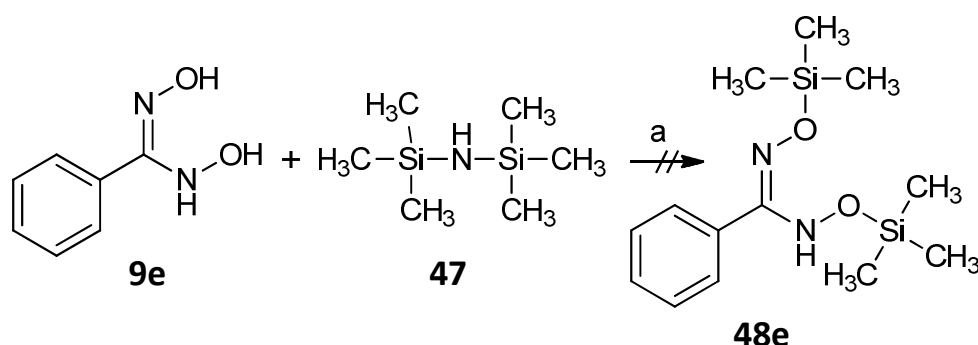


Abbildung 3-22 Die Synthese von *O,O'*-Bis(trimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**48e**) aus BDHA **9e** mit HMDS **47** in Anlehnung an eine Vorschrift von Shaterian *et al.* [2008] führte durch die basischen Reaktionsbedingungen zur Zersetzung der Ausgangsverbindung **9e** ohne Bildung des gewünschten Reaktionsproduktes **48e**.¹³⁴ a: Acetonitril, Natriumhydrogensulfat-Kieselgel.

Ein weiterer Reaktionsversuch, BDHA **9e** mit Trimethylchlorsilan als Standard-Reagenz und Dimethylaminopyridin (DMAP) als Hilfsbase zu *O,O'*-Bis(trimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**48e**) umzusetzen, blieb ebenfalls erfolglos. Wahrscheinlich waren auch hier die basischen Bedingungen durch das DMAP, welche für das Gelingen von Silylierungsreaktionen mit Chloriden aber essenziell waren, ursächlich für das Misslingen der Reaktion.

Außerdem wurde versucht, eine Esterderivatisierung der Sauerstoffe des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (**9e**) durchzuführen. Dadurch sollte einerseits die Stabilität der Verbindungen im Neutralen und Basischen erhöht werden, andererseits aber auch gewährleistet sein, dass die funktionellen Gruppen *in vivo* wieder schnell entschützt werden können. Da Esterasen überall im Organismus vorkommen, würden Esterbindungen vollständig und schnell gespalten.¹³⁵ Für die Spaltung der stabileren Etherbindungen hingegen sind unter anderem CYP450-Enzyme verantwortlich, wodurch sich Interaktionen mit anderen Arzneistoffen ergeben könnten. Daher wurde versucht, den einfachsten Ester von BDHA **9e**, das *O,O'*-Diacetyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OAc **50e**) aus *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) und Acetanhydrid **49** zu

synthetisieren. Üblicherweise würde dem Reaktionsansatz zusätzlich eine Base als Katalysator zugegeben, welche bei erfolgreicher Reaktion gleichzeitig die frei werdende Essigsäure neutralisierte.^{136,137} Die durchgeführte Synthese verlief allerdings schon bei der Zugabe des Acetanhydrids **49** zur Lösung aus *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) in Ethylacetat bei 0 °C unter Zersetzung der Ausgangsverbindung **9e**. Auch die anschließende Zugabe von Triethylamin konnte nicht zur Bildung des gesuchten BDHA2OAc **50e** führen (siehe Abbildung 3-23). Der Wechsel des Lösungsmittels zu Acetonitril brachte ebenfalls keine Verbesserung des Ergebnisses.

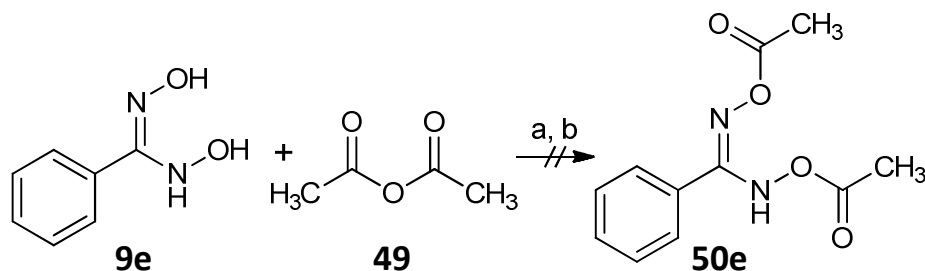


Abbildung 3-23 Die Synthese von *O,O'*-Diacetyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**50e**) aus BDHA **9e** und Acetanhydrid **49** war unter verschiedenen Bedingungen nicht erfolgreich. a: in Ethylacetat oder Acetonitril bei 0 °C, TEA; b: Pyridin, 0 °C.

Eine für Amidoxime **14** beschriebene Vorschrift von Eloy *et al.* [1962] mit Acetanhydrid und Pyridin als Hilfsbase, welche im ersten Schritt miteinander zur Reaktion gebracht wurden, war offensichtlich nicht übertragbar auf BDHA **9e**, da dessen Zugabe bei 0 °C ebenfalls nicht das Produkt *O,O'*-Diacetyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**50e**) lieferte (siehe Abbildung 3-23).¹³⁸

Da die Acetylierungsversuche mit Essigsäureanhydrid **49** nicht erfolgreich verliefen, sollte der bewährte klassische Syntheseweg der Reaktion von BOxCl **18e** mit einem substituierten Hydroxylamin getestet werden (siehe Abbildung 3-24). Für die gewünschte Veresterung wurde zunächst versucht, *O*-Acetylhydroxylamin in Anlehnung an eine Vorschrift von Geffken *et al.* [1986] zu synthetisieren.¹³⁹

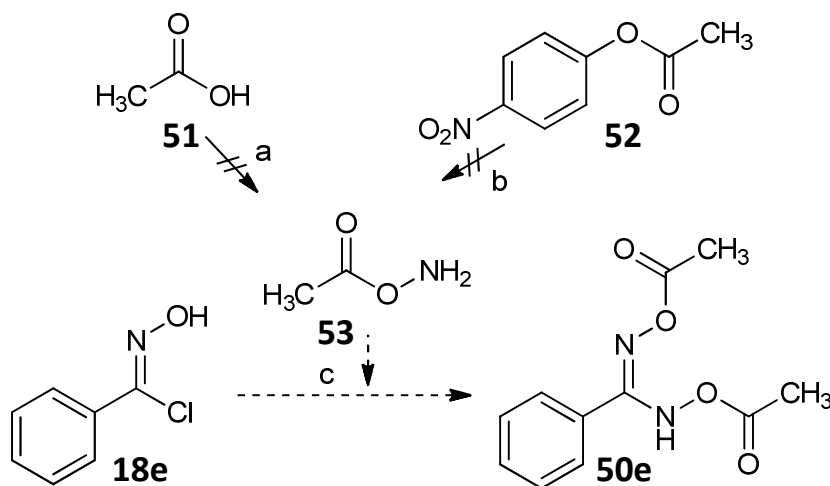


Abbildung 3-24 Die Synthese von *O,O'*-Diacetyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**50e**) aus Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) mit einem Hydroxylamin **53** scheiterte an der Herstellung des Reagenzes **53** aus Essigsäure **51** oder *p*-Nitro-*O*-acetylphenol (**52**). a: 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI), Hydroxylaminhydrochlorid, trockenes DCM, Ar-Begasung, Ether, HCl-Gas; b: Hydroxylamin, Wasser/Ethanol, 0 °C; c: DCM, RT.

Dazu wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) in trockenem Dichlormethan gelöst. Reine, wasserfreie Essigsäure **51** wurde hinzugegeben, bis keine Gasbildung mehr zu beobachten war. Daraufhin wurde dem Ansatz im Mörser fein pulverisiertes Hydroxylaminhydrochlorid zugefügt und kräftig geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit weiterem Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit verdünnter Salzsäure und Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und im Vakuum auf die Hälfte eingeeengt. Nach Zugabe von reinem Diethylether wurde unter Blasenbildung trockenes HCl-Gas eingeleitet. *O*-Acetylhydroxylamin (**53**) sollte daraufhin als Hydrochlorid ausfallen, jedoch bildete sich kein Feststoff (siehe Abbildung 3-24). Da der Syntheseweg für Benzoessäure beschrieben wurde, ist es möglich, dass er schlichtweg nicht auf Essigsäure **51** übertragbar war.¹³⁹ Ein möglicher Grund könnte die geringere Acidität der aliphatischen Säure **51** im Vergleich zur aromatischen Benzoessäure sein.

Eine weitere Literaturvorschrift gab an, dass das Hydroxylaminreagenz **53** aus *p*-Nitro-*O*-acetylphenol (**52**) mit Hydroxylamin als freier Base in einem Gemisch aus Ethanol und Wasser bei 0 °C hergestellt werden konnte (siehe Abbildung 3-24).^{140,141} Wie in der Vorschrift beschrieben verfärbte sich das Reaktionsgemisch sofort gelb. Die anschließende Entfärbung blieb hingegen aus. Trotzdem wurde der Ansatz fraktioniert destilliert, wodurch *O*-Acetylhydroxylamin (**53**) jedoch nicht gewonnen werden konnte. Eine Umsetzung des in einem neuen Ansatz hergestellten Rohproduktes von **53** ohne Destillation mit Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) zu Produkt **50e** gelang ebenfalls nicht, wodurch die Destillation als Ursache des Scheiterns der Herstellung des Reagenzes **53** ausgeschlossen werden konnte.

Ein weiteres Reagenz **55** zur Darstellung von Acetyl-Estern wurde von Lee *et al.* [2012] beschrieben (siehe Abbildung 3-25).¹⁴² Dazu wurden Diethylether und Triethylamin in einem Kolben auf 0 °C abgekühlt und Essigsäure **51** bei gleichbleibender Temperatur hinzugegeben. Nach der Reaktion wurde Chlorameisensäureethylester **54** tropfenweise hinzugefügt und bei 0 °C weiter gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit verdünnter Zitronensäure, Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Natriumchloridlösung nacheinander gewaschen, das

Lösungsmittel mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum entfernt. Acetylethylkohlsäure **55** verblieb als farbloses Öl im Rückstand.

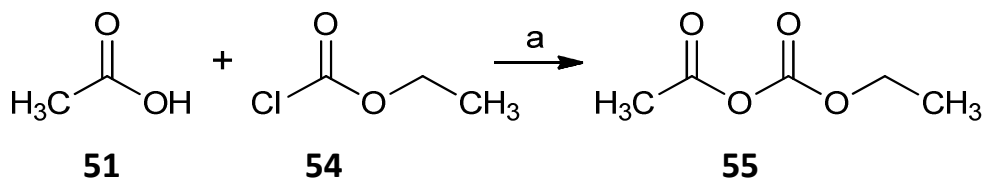


Abbildung 3-25 Das Reagenz Acetylethylkohlsäure **55** konnte aus Essigsäure **51** und Chlorameisensäureethylester **54** synthetisiert werden. a: TEA, Diethylether, 0 °C, Ausbeute 74 %.

Auch dieses Reagenz **55** sollte in Anlehnung an Eloy *et al.* [1962] mit *N,N'*-Dihydroxybenzamidin **9e** analog zu Abbildung 3-24 ebenfalls zu BDHA2OAc **50e** umgesetzt werden.¹³⁸ Dazu wurde die Ausgangsverbindung **9e** bei Raumtemperatur in Diethylether gelöst und die hergestellte Acetylethylkohlsäure **55** hinzugefügt. Nach einer halben Stunde war dünnschichtchromatographisch kein BDHA **9e** mehr nachweisbar. Die Analyse des Produktes ergab allerdings, dass Benzamidoxim (**14e**) entstanden war, sich die empfindliche Dihydroxyamidin-Funktion also durch das Reagenz zersetzt hatte. Auch die Acetylierung von Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) zum *O*-acetylierten Produkt **56e** gelang nicht. Nach einem Tag lag der Ausgangsstoff **18e** immer noch unverbraucht vor (siehe Abbildung 3-26, a und b).

Da man aufgrund der vielen missglückten Synthesen an der Richtigkeit der allgemeinen Methodik der Acetylierung von Hydroxylgruppen zweifeln musste, wurde ein Positivtest mit eben der Verbindung durchgeführt, mit welcher die Synthese in der Literatur beschrieben wurde.¹³⁸ Es wurde Benzamidoxim (**14e**) in Diethylether gelöst und das Reagenz bei Raumtemperatur zugegeben. Man konnte sofort die Entstehung einer Trübung erkennen. Nach einer Stunde wurde die Reaktion abgebrochen. Die Analyse mittels NMR-Spektroskopie ergab, dass BAO **14e** quantitativ zu *O*-Acetylbenzamidoxim (**57e**) umgesetzt wurde (siehe Abbildung 3-26, c). Folglich liegt es an den Eigenschaften der Dihydroxyamidin-Funktion, dass eine Acetylierung nicht gelang.

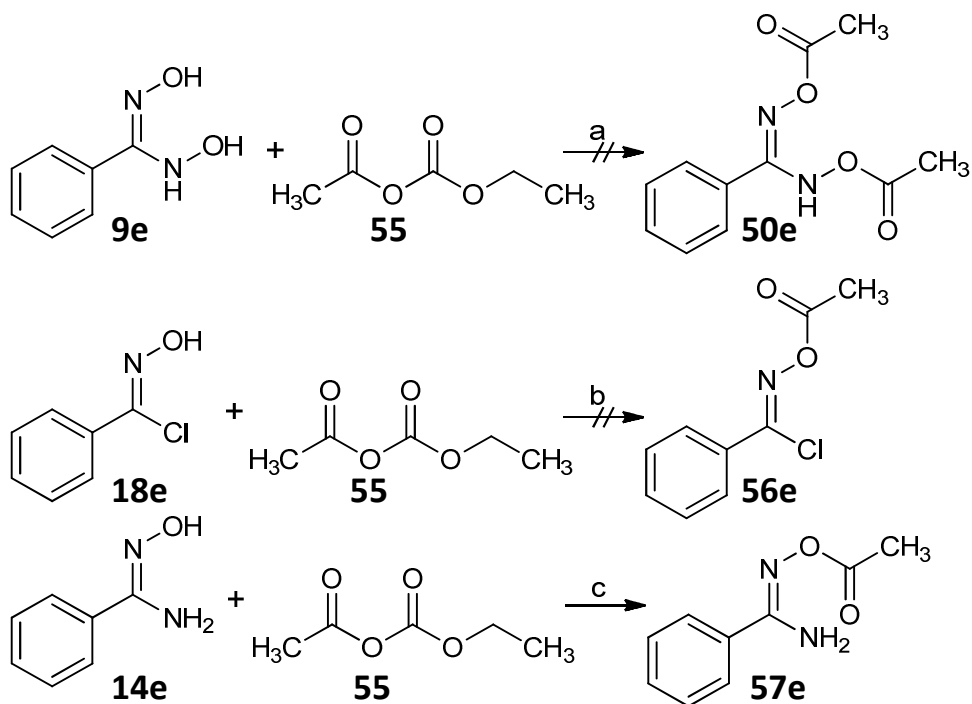


Abbildung 3-26 Die Acetylierung von Benzamidoxim 14e mit Acetylethylkohlsäure 55 zu *O*-Acetylbenzamidoxim 57e als Positivkontrolle verlief erfolgreich, die Acetylierung von BDHA 9e und BOxCl 18e zu den Produkten 50e und 56e jedoch nicht. a, b, c: Diethylether, RT, c: Ausbeute 99 %.

Es wurde ein weiterer Versuch unternommen, am Sauerstoff veresterte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine herzustellen. Dafür wurde nach einer allgemeinen Vorschrift von Geffken [1986] vorgegangen und zunächst das Hydroxylamin-Reagenz hergestellt, indem Pivalinsäure **58** in trockenem Dichlormethan mit CDI bis zur Beendigung der Gasentwicklung gerührt wurde.¹⁴³ Fein pulverisiertes Hydroxylaminhydrochlorid wurde hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase durch Zugabe von Lösungsmittel vergrößert, nacheinander mit eiskalter verdünnter Salzsäure und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach teilweisem Verdampfen des Dichlormethans im Vakuum und Zugabe von Diethylether wurde HCl-Gas eingeleitet. Wenige Sekunden später fiel das Produkt **59** schlagartig als Hydrochlorid aus (siehe Abbildung 3-27).

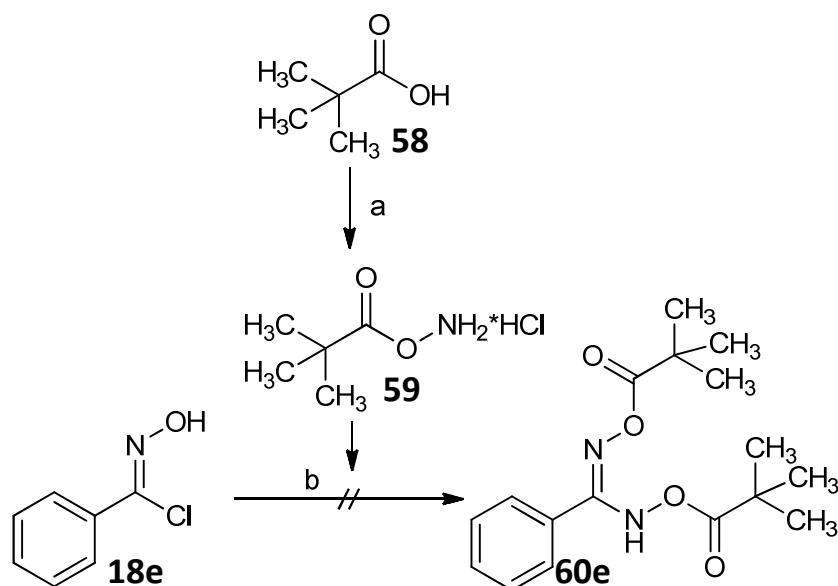


Abbildung 3-27 Die Synthese von *O,O'*-Dipivalyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**60e**) scheiterte an der Umsetzung mit dem erfolgreich hergestellten Reagenz *O*-Pivalylhydroxylaminhydrochlorid **59** aus **58**. a: CDI, Hydroxylaminhydrochlorid, trockenes Dichlormethan, Diethylether, HCl-Gas, das Produkt **59** wurde als Hydrochlorid gefällt (Ausbeute 34 %); b: Triethylamin, Dichlormethan, RT.

Daraufhin konnte BOxCl **18e** mit dem hergestellten *O*-Pivalylhydroxylaminhydrochlorid **59** und TEA in Dichlormethan auf bekannte Weise zur Reaktion gebracht werden (siehe Kapitel 3.2.3.1 bis 3.2.3.5). Der Reaktionsverlauf wurde über den Zeitraum von sechs Tagen mittels Dünnschichtchromatographie überprüft, jedoch konnte keine Bildung eines Produktes festgestellt werden. Es lag nach sechs Tagen weiterhin nur die Ausgangsverbindung **18e** vor (siehe Abbildung 3-27).

Da alle Veresterungsversuche auf klassischen Synthesewegen nicht zum Erfolg führten, sollte die Umsetzung mit einer Protease/Esterase als eine Methode, die in der Industrie bereits weit verbreitet war, getestet werden.¹⁴⁴ Als geeignetes Enzym, welches Veresterungen von Hydroxylgruppen eines relativ großen Stoffgruppenbereiches katalysierte, wurde *Subtilisin* ausgewählt.¹⁴⁴ Es wurde nach einer Vorschrift von Ottolina *et al.* [1991] aufgearbeitet, indem es zunächst in *Aqua bidest* gelöst, auf pH 7.4 eingestellt und gefriergetrocknet wurde.¹⁴⁵ Ein leicht alkalisches Milieu (pH 7.8) wäre optimal für die Wirkung des *Subtilisin*, jedoch verhielten sich Dihydroxyamidine instabiler, je alkalischer der pH-Wert gewählt wurde. Bei neutralem pH sollte das *Subtilisin* laut Literatur trotzdem noch gut katalysieren.¹⁴⁴ Die Umsetzung von BDHA **9e** erfolgte in *tert*-Amylalkohol unter Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid **61** und *Subtilisin*.¹⁴⁵ Nach einer Stunde war kaum noch Ausgangsverbindung **9e** nachweisbar und nach zwei Stunden war BDHA **9e** dünnschichtchromatographisch nicht mehr zu erkennen. Die massenspektrometrische Analyse wies Benzamidoxim (**14e**) als Zersetzungsprodukt von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) nach. *O*-Succinyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOSucc **62/62'e**) oder *O,O'*-Disuccinyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OSucc **63**) lagen nicht vor.

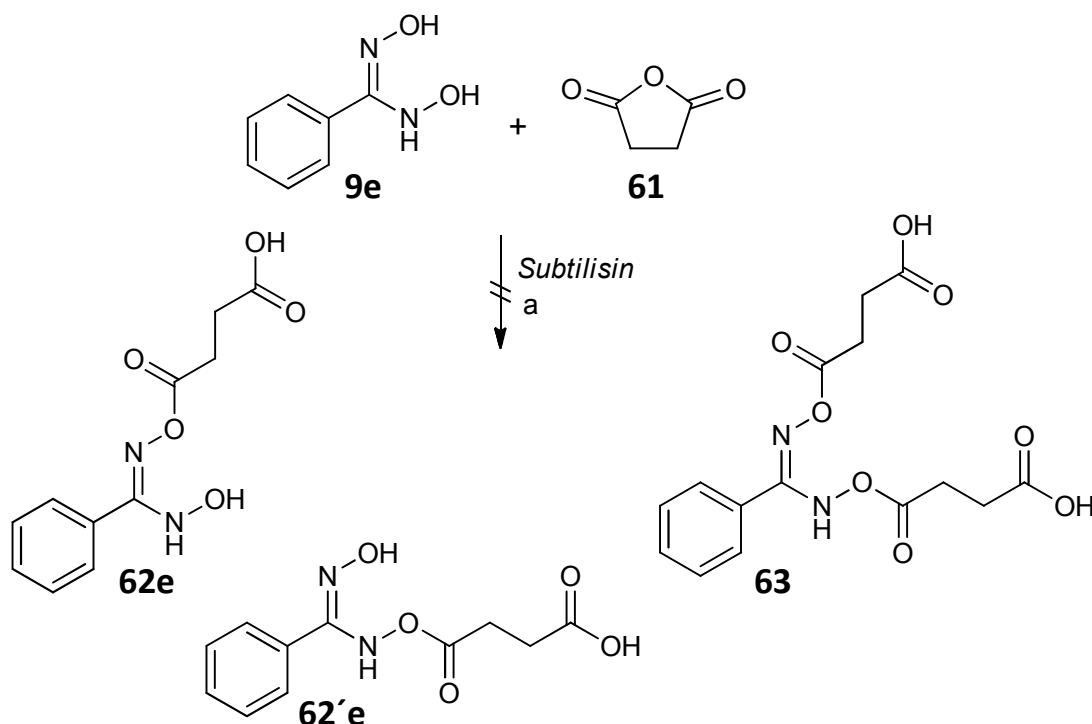


Abbildung 3-28 Die enzymatische Herstellung von BDHAOSucc 62/62'e oder BDHA2OSucc 63 mit *Subtilisin* gelang nicht. a: *tert*-Amylalkohol, RT.

3.2.4 Physikochemische Eigenschaften

3.2.4.1 Stabilitätsuntersuchungen

3.2.4.1.1 Einleitung

Die Stabilität des einfachsten aromatischen Dihydroxyamidins, dem *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA, **9e**), wurde bereits von Reeh [2008] untersucht.^{69,91} Es zeigte sich eine deutliche Instabilität der Verbindung im Neutralen, hingegen war die Substanz im Säuren in einem Zeitraum von zwei Stunden relativ stabil. Die Stabilität im basischen wässrigen Puffermedium wurde nicht untersucht. Für erste Hinweise bezüglich der Stabilität wurden BDHA **9e**, *O*-methylierte und *O*-benzylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **31/31'e**, **10/10'e**, **30e**, **32e** *per DC* untersucht. Zum aussagekräftigen Vergleich der Stabilitäten unterschiedlicher *O*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine mittels HPLC wurde die Zersetzung der Grundstruktur BDHA **9e** zusätzlich erneut vermessen. So konnte sichergestellt werden, dass alle Proben eine gleiche Behandlung vor der Vermessung mittels HPLC erfahren. Es wurde die Stabilität von BDHA **9e**, *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOMe **31/31'e**), *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (BDHAAce **13d**) genau bestimmt. Hinweise auf den Einfluss des *para*-Substituenten X auf die Zersetzungsgeschwindigkeit konnten NMR-Untersuchungen in DMSO-*d*₆ liefern, wenngleich das Verhalten der Verbindungen in wässrigen Puffern abweichen könnte.

3.2.4.1.2 Durchführung

Für schnelle Hinweise auf die Stabilität von BDHA **9e**, *O*-Benzyl-*N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHAOBn **10/10'e**), BDHAOMe **31/31'e**, *O,O'*-Dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OBn **32e**) und BDHA2OMe **30e** wurden die Verbindungen in einem Eppendorfgefäß in Acetonitril (ACN, neutral), ACN/1 % Ameisensäure (sauer) und ACN/1 % TEA (basisch) gelöst, sofort eine Probe auf eine DC-Platte aufgetragen und entwickelt. Weitere Proben wurden nach 1 h, 5 h, 25 h und 52 h mittels DC analysiert. Es wurde ACN anstelle eines wässrigen Puffers verwendet, da so keine Löslichkeitsprobleme zu erwarten waren und das Lösungsmittel auf der DC-Platte schnell verdampft. Die möglichen Metabolite BA **15**, Benzamid (BAmid), Benzonitril (BCN), *O*-Methylbenzamidoxim (BAOMe **72**), Benzaldoxim (BOx **17**) und das dimere Synthesenebenprodukt 3,5-Di-phenyl-1,2,4-oxadiazol-4-oxid (Dimer **64**) wurden als Referenzsubstanzen auf eine DC-Platte aufgetragen und mit dem gleichen Fließmittel entwickelt.

Zur Untersuchung der Stabilität *O*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine mittels HPLC wurde eine kleine Menge Substanz der Verbindungen BDHA **9e**, BDHAOMe **31/31'e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** zu wenig DMSO gegeben, um die Proben vollständig zu lösen. Dazu wurden Phosphatpuffer der pH-Werte 2.0, 6.3, 7.4 und 9.0 pipettiert, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand, welcher keine ungelösten Bestandteile enthalten durfte, wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von zwei Stunden wurden Proben gezogen, mit Acetonitril/1 % Ameisensäure verdünnt, geschüttelt und mittels HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.2.2 und 7.2.3). Die Ameisensäure sollte eine weitere Zersetzung der Verbindungen verhindern, da literaturbeschrieben war, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) sich im Sauren stabiler als im Neutralen oder Basischen verhielt. Die Auswertung erfolgte prozentual bezogen auf die Fläche der untersuchten Verbindung bei null Minuten.

Zur Detektion der Zersetzungsprodukte wurden alle theoretisch möglichen Metabolite mittels HPLC vermessen. Nicht kommerziell erhältliche Verbindungen wurden zuvor synthetisiert (siehe Kapitel 3.4 und 7.1.2.15). Die zunächst entwickelte HPLC-Methode eignete sich, um Metabolite mit einer kurzen Retentionszeit wie Benzamid (BAmid), Benzoessäure, Benzhydroxamsäure (BHyS), Benzonitril und BOx **17** mit Hilfe des Fließmittelgradienten gut voneinander zu trennen (siehe Kapitel 7.2.3, Methode A). Die Hauptmetabolite Benzamidoxim (**14**), *O*-substituierte Benzamidoxime **72,73** und BA **15** besaßen allerdings eine ähnliche Retentionszeit wie die untersuchten Verbindungen. Deswegen wurde eine weitere HPLC-Methode zur Trennung der Hauptmetabolite von den untersuchten Verbindungen entwickelt. Durch den Verzicht auf einen Gradienten unterschieden sich die Retentionszeiten der Substanzen hier maximal voneinander (siehe Kapitel 7.2.3, Methode B). Zur Verifizierung der Ergebnisse und zur Untersuchung eventuell unerkannter oder nicht bedachter Metabolite wurden alle Proben zusätzlich mittels Massenspektrometrie vermessen.

Außerdem wurden Untersuchungen der Stabilität aller *para*-substituierter *O*-monosubstituierter Derivate in dem NMR-Lösungsmittel DMSO-*d*₆ durchgeführt. Dazu wurde eine relativ konzentrierte NMR-Probe (ca. 50 mg in 450 µl DMSO-*d*₆) sehr frisch angelöst und vermessen. Nach einem Zeitraum von einigen Stunden wurde ein weiteres Spektrum mit der gleichen Probe aufgenommen. Durch Integration der Substanzpeaks und der Signale der Zersetzungsprodukte konnte die Zersetzungsgeschwindigkeit bestimmt werden.

3.2.4.1.3 Ergebnisse

Die DC-Untersuchungen von BDHA **9e**, BDHAOMe **31/31'e**, BDHAOBn **10/10'e**, BDHA2OMe **30e** und BDHA2OBn **32e** zeigten eine deutliche Instabilität von BDHA **9e** und den *O*-monosubstituierten Derivaten **31/31'e** und **10/10'e** im basischen Medium mit ACN und 1 % TEA. Dabei war erkennbar, dass BDHAOBn **10/10'e** am schnellsten zerfiel. Nach fünf Stunden war keine Ausgangsverbindung mehr erkennbar. BDHAOMe **31/31'e** war zu diesem Zeitpunkt noch in Spuren vorhanden und BDHA **9e** war neben vielen Zersetzungsprodukten noch deutlich zu erkennen. Als Zersetzungsprodukt sowohl von BDHA **9e** als auch von den *O*-monosubstituierten Derivaten **31/31'e** und **10/10'e** konnte *per* DC relativ sicher BAO **14** bestimmt werden. Aus BDHA **9e** entstand außerdem das Dimer **64** und eventuell BOx **17** während BDHAOMe **31/31'e** wahrscheinlich zum Teil in BAmid zerfiel. Zusätzlich entstanden sehr hydrophile Produkte, die auf der Grundlinie der DC-Platte verblieben und deswegen mit der gewählten Fließmittelzusammensetzung nicht weiter differenziert werden konnten. Die *O,O'*-disubstituierten Verbindungen **30e** und **32e** waren über einen Zeitraum von zwei Tagen stabil.

Die Analyse der Stabilität von BDHA **9e**, BDHAOMe **31/31'e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** in wässrigen Puffermedien unterschiedlicher pH-Werte bei 37 °C mittels HPLC bestätigte die dünnstschichtchromatographisch gewonnenen Ergebnisse in vielerlei Hinsicht. So erwiesen sich BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** als sehr stabil (siehe Abbildung 3-31 und Abbildung 3-32) im Vergleich zu BDHA **9e** und BDHAOMe **31/31'e** (siehe Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30). Die Stabilität war besonders im Basischen durch die zweifache Substitution der Sauerstoff-Atome auffällig, da über den Zeitraum von zwei Stunden keine Zersetzungsprodukte detektiert werden konnten. Hingegen deutete sich im Sauren (pH 2.0) eine tendenzielle Instabilität von BDHA2OMe **30e** mit einem Anteil von 85 % nach 120 Minuten an. Bei pH 9.0 lagen nach zwei Stunden weiterhin 100 % **30e** vor. Ähnlich stabil verhielt sich das cyclische Derivat BDHAAce **13d**. Bei dem pH-Wert von 2.0 erwiesen sich BDHA **9e** und BDHAOMe **31/31'e** noch am stabilsten im Vergleich zu allen anderen pH-Puffern, doch war die Zersetzung der von BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** auch hier deutlich überlegen. Im Neutralen und Basischen zersetzten sich BDHA **9e** und BDHAOMe **31/31'e** sehr schnell. Nach zwei Stunden konnte keine Ausgangsverbindung mehr nachgewiesen werden.

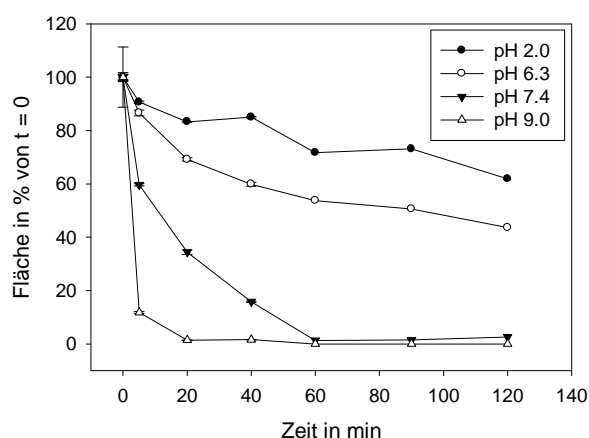


Abbildung 3-29 Zersetzung von BDHA **9e** in 100 mM Phosphatpuffer unterschiedlicher pH-Werte bei 37 °C über 2 h. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (MW \pm STABW) aus zwei Injektionen in die HPLC.

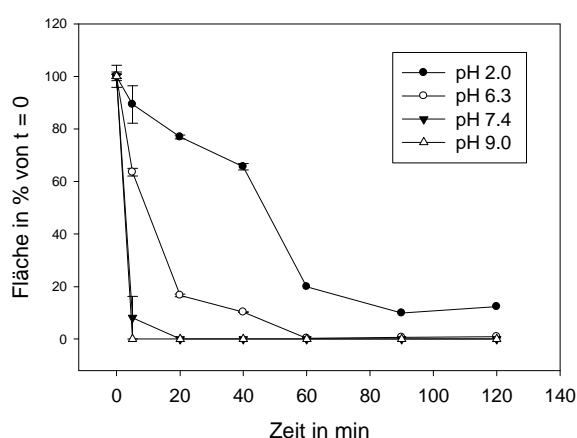


Abbildung 3-30 Zersetzung von BDHAOMe **31/31'e** in 100 mM Phosphatpuffer unterschiedlicher pH-Werte bei 37 °C über 2 h. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Injektionen in die HPLC.

Die in Abbildung 3-29 bis Abbildung 3-32 gezeigten Standardabweichungen kamen durch die zweifache Vermessung der Proben zustande. Die scheinbar leichte Zunahme der bestimmten Fläche unter dem Peak BDHAOMe **31/31'e** bei pH 2.0 für war durch die Vielzahl der entstandenen Abbauprodukte zu erklären, welche eine ähnliche Retentionszeit besaßen (siehe Abbildung 3-30). Hier wurden die Grenzen der mittels HPLC erreichbaren eindeutigen Zuordnung der Signale deutlich. Da es sich um dieselbe Probe handelte, war eine Zunahme der Konzentration nicht möglich. Eine Rückbildung von BDHAOMe **31/31'e** aus den Abbauprodukten konnte ausgeschlossen werden.

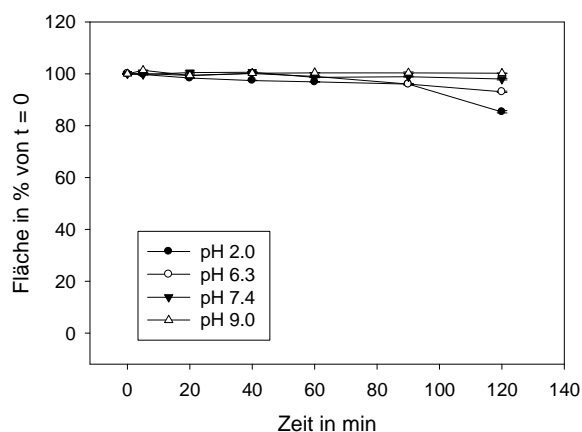


Abbildung 3-31 Zersetzung von BDHA2OMe **30e** in 100 mM Phosphatpuffer unterschiedlicher pH-Werte bei 37 °C über 2 h. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Injektionen in die HPLC.

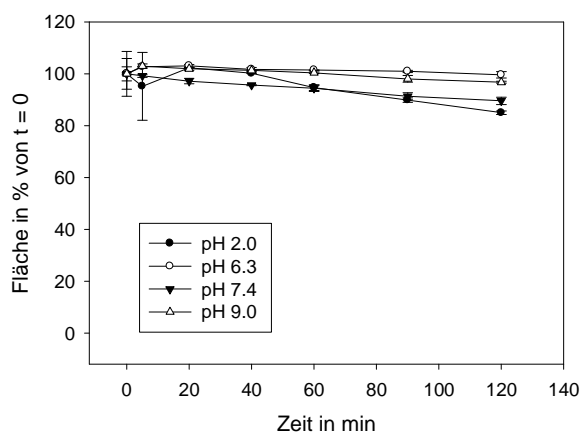


Abbildung 3-32 Zersetzung von BDHA Ace **13d** in 100 mM Phosphatpuffer unterschiedlicher pH-Werte bei 37 °C über 2 h. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Injektionen in die HPLC.

Es wurden, parallel zur Untersuchung der Stabilität mittels HPLC, Proben für die Massenspektrometrie auf gleiche Weise behandelt. Aufgrund der Inkompatibilität des verwendeten octylsulfonathaltigen Fließmittels mit der Massenspektrometrie wurden die Verbindungen mit der Standardanalytik (0.1 % Essigsäure/Acetonitril-Gradient) voneinander getrennt und mittels Elektrosprayionisierung analysiert (siehe Kapitel 7.1.1, Massenspektrometrie, Methode A). Die gemessenen Stoffmengen und die HPLC-Chromatogramme zeigten das Entstehen von Benzhydroxamsäure (BH₂S) und BAO **14** aus BDHA **9e** im Sauren an. Bei neutralem pH-Wert zersetzte sich die Verbindung zusätzlich zu BAmid und dimerisierte zu **64c** (**64a** und **b** siehe Kapitel 4.6). Im Basischen war das Dimer **64c** das mengenmäßig dominante Produkt.

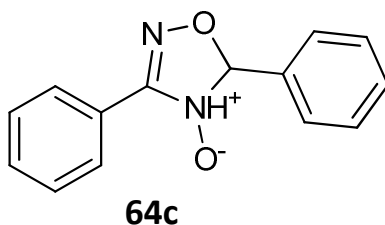


Abbildung 3-33 Bisher nicht detektiertes dimeres Produkt **64c**, was aus BDHA **9e** durch Instabilität in neutralen und basischen wässrigen Medien entsteht.

Zusätzlich konnte wenig Benzonitril nachgewiesen werden. Trotz vorheriger Untersuchung der Stabilität von BDHA **9e** auch im neutralen und basischen Puffermedium wurde das hauptsächlich

entstehende Produkt der Zersetzung, das Dimer 3,5-Diphenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-4-oxid (**64c**) (Abbildung 3-33), nicht beschrieben.

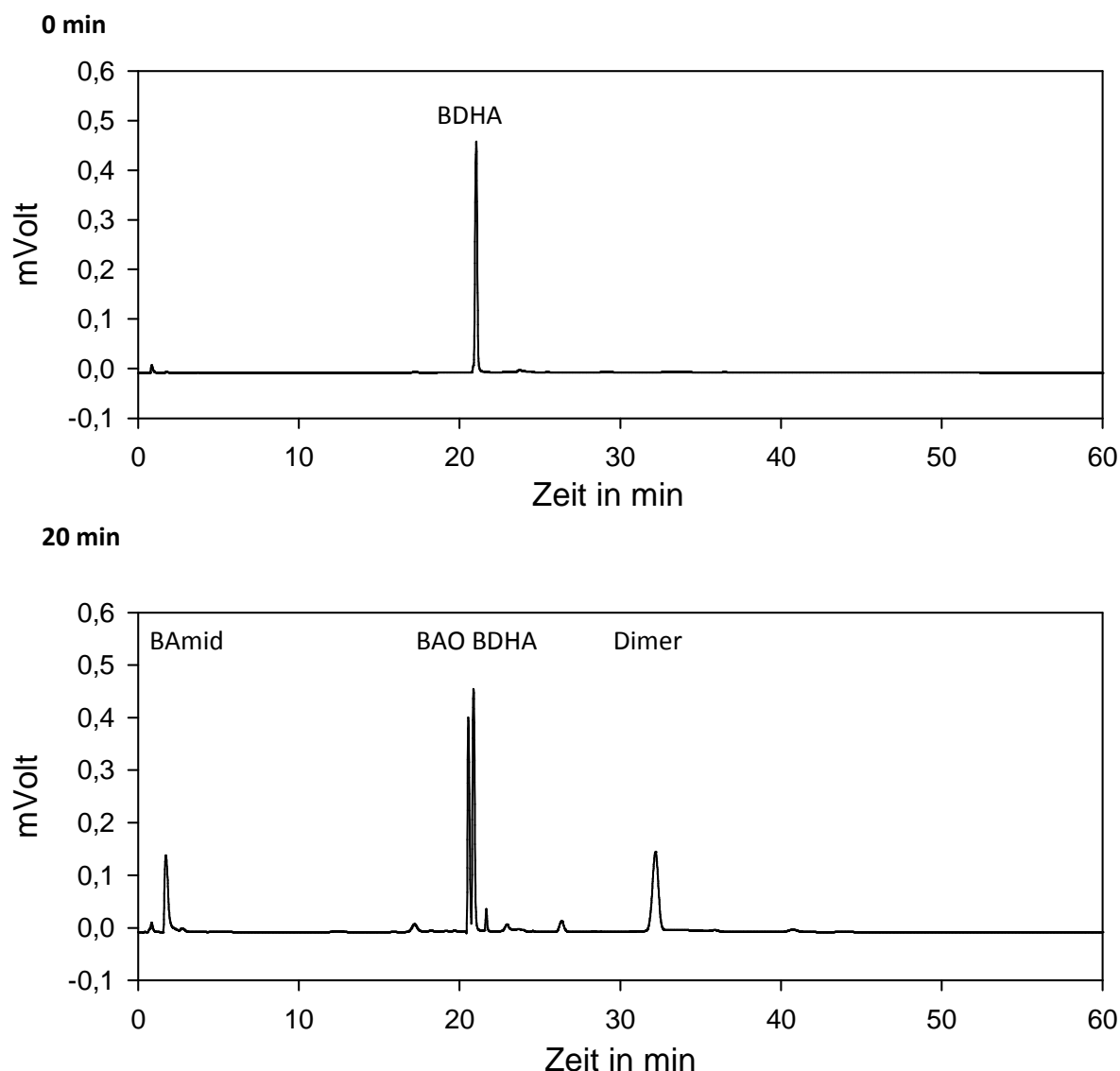


Abbildung 3-34 HPL-Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchung von BDHA **9e** im Phosphatpuffer pH 7.4 nach 0 bzw. 20 min.

In der HPLC wies das Dimer **64** eine hohe Retentionszeit auf und konnte nur mit Hilfe der Gradientenmethode A aus Kapitel 7.2.3 detektiert werden (siehe Abbildung 3-34). Bei Verwendung der isokratischen Methode B verblieb die Verbindung auf der HPLC-Säule. Als Produkt mit einer derart hohen Retentionszeit und somit als dominierendes Zerfallsprodukt von BDHA **9e** im Basischen wurde von Reeh [2008] Benzonitril beschrieben.⁹¹ Dies konnte nicht nachvollzogen werden, da die Referenzsubstanz nach Injektion deutlich früher eluierte. In der LC/MS-Kopplung (*Liquid Chromatography / Mass Spectrometry*) in Abbildung 3-35 erkannte man das Ausmaß der Entstehung und die Identität des Dimers **64** (Peak 4) schon im Neutralen nach 20 Minuten. Zusätzlich entstand ein Massepeak von $[M + H]^+ = 477$, welcher der dimerisierten Verbindung **64** zugeordnet werden konnte. Derartige Cluster können sich immer dann bilden, wenn eine hohe Konzentration einer (lipophilen) Verbindung vorliegt. Außerdem wurde das durch ein Natriumion positiv geladene

Produkt **64** detektiert (siehe Abbildung 3-35). Das Chromatogramm im Basischen zeigte sogar noch mehr Dimer **64**, wobei die Ausgangsverbindung BDHA **9e** völlig verschwand. Benzonitril konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden, weil es unter ESI-Bedingungen keine Ionen lieferte. Allerdings war BCN eindeutig *per* HPLC bestimmbar, da alle anderen Abbauprodukte eine deutlich abweichende Retentionszeit besaßen (siehe Kapitel 7.2.3, Methode A). So war zu erkennen, dass es nur in geringem Maße und nur unter basischen Bedingungen entsteht.

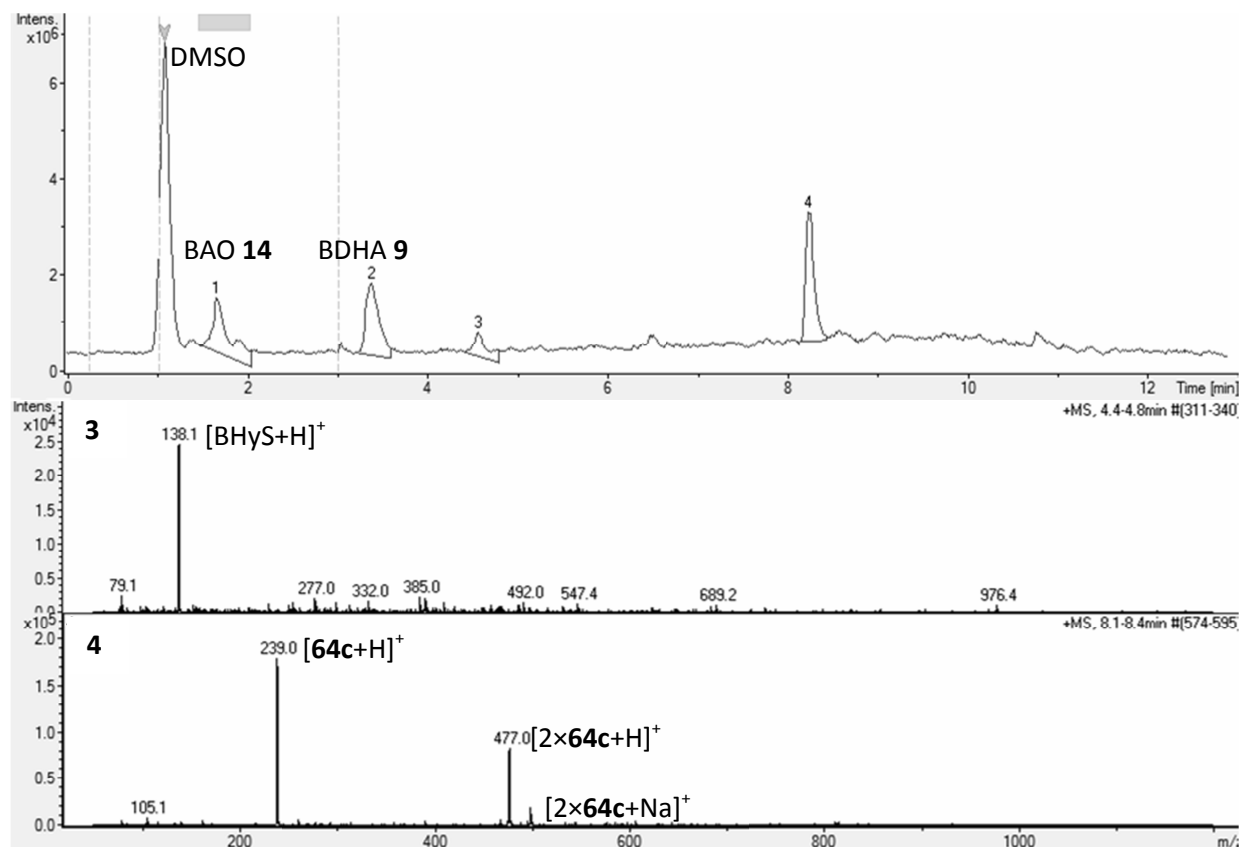


Abbildung 3-35 Massenspektrometrie von BDHA **9e** nach Inkubation bei 37 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 für 20 min. Peak bei 1 min = DMSO, 1 = Benzamidoxim (BAO **14**), 2 = *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA **9e**), 3 = Benzhydroxamsäure (BHyS), 4 = Dimer **64c**. Das Dimer **64c** mit der molaren Masse von 238 g/mol konnte als das Hauptprodukt identifiziert werden.

Die Analyse der Stabilitäten aller synthetisierten Dihydroxybenzamidine mittels NMR-Spektroskopie in DMSO-*d*₆ bestätigte die sehr gute Beständigkeit der zweifach substituierten Derivate, da keine Abbauprodukte nach einem Tag in Lösung detektiert werden konnten. Im Gegensatz zum Verhalten im wässrigen Medium waren alle *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **9** in DMSO-*d*₆ ebenfalls im Zeitraum von 24 Stunden stabil. Hingegen zersetzten sich die *O*-monosubstituierten Verbindungen **31/31'** und **10/10'** deutlich nach einigen Stunden.

Tabelle 3-8 NMR-spektroskopisch bestimmte Zerfallsgeschwindigkeiten *v* der *O*-monosubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **31/31'** und **10/10'** in DMSO-*d*₆ in %/h bei Annahme einer linearen Zersetzung.

Hammett-Konstante σ^{120}	<i>para</i> -Substituent X	<i>p</i> X-BDHAOMe 31/31' <i>v</i> in %/h	<i>p</i> X-BDHAOBn 10/10' <i>v</i> in %/h
-0.38	OH	- ²	1.26
-0.28	OMe	0.29	0.35

² Die Verbindung konnte nicht synthetisiert werden.

Hammett-Konstante σ^{120}	<i>para</i> -Substituent X	<i>p</i> X-BDHAOMe 31/31' ν in %/h	<i>p</i> X-BDHAOBn 10/10' ν in %/h
-0.14	Me	0.73	0.45
0	H	0.26	0.62
0.26	Br	2.10	0.53
0.70	CN	3.45	1.66
0.81	NO ₂	- ²	16.31

Um zu untersuchen, ob die Substituenten in *para*-Position des Aromaten X einen Einfluss auf die Stabilität der Verbindungen besitzen, wurden die Zerfallsgeschwindigkeiten in %/h berechnet und vergleichend in Tabelle 3-8 aufgeführt. Die Hammett-Konstante σ gibt bei kleinen, negativen Werten an, dass die Elektronendichte des Aromaten im Vergleich zum Wasserstoffatom ($\sigma = 0$) erhöht wird. Große Werte verringern die Elektronendichte des Aromaten.¹²⁰ Es zeigte sich die deutliche Tendenz, dass elektronenziehende Substituenten X die Stabilität einer Verbindung verringern und deren Zerfallsgeschwindigkeit ν steigern. Ein Ausreißer dieser Schlussfolgerung bildete das *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'b**) mit einer relativ hohen Zerfallsgeschwindigkeit trotz Elektronenschub. Diese Abweichung könnte auf die generelle Instabilität der Verbindung auch ohne Lösungsmittelzusatz zurückzuführen sein. *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'b**) erwies sich als einziges Derivat als sehr instabil nach der Synthese. Unter bereits optisch erkennbarer Zersetzung entwickelte die Verbindung **10/10'b** sich binnen weniger Stunden von einem gelben Öl über Orange- und Braunfärbung zu einem schwarzen Rückstand. Alle anderen monosubstituierten BDHAs **31/31'b-g** und **10/10'c-h** sind bei Raumtemperatur ohne Lösungsmittelzusatz wenigstens zwei Tage absolut stabil. Aus Vorsicht wurden alle Verbindungen allerdings bei -18 °C gelagert. *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'h**) zeigte eine überraschend schlechte Stabilität in DMSO-*d*₆. Dies unterstützt aber die Annahme, dass elektronenziehende Substituenten X in *para*-Position die *O*-monosubstituierten BDHAs **31/31'** und **10/10'** destabilisieren.

3.2.4.2 Bestimmung der Löslichkeit

3.2.4.2.1 Einleitung

Trotz ausführlicher Charakterisierung von BDHA **9e** in der Vergangenheit wurde dessen Löslichkeit in wässrigen Medien bislang noch nicht bestimmt.^{69,71} Die Löslichkeit dieser Grundstruktur **9e** wurde bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen und mit der Löslichkeit eines an beiden Sauerstoffatomen substituierten Derivates (BDHA2OMe **30e**) und eines cyclischen Derivates (BDHAAce **13d**) verglichen. Es wurde als unsinnig eingeschätzt, die Löslichkeit einer der als äußerst instabil eingeschätzten monosubstituierten Verbindungen wie BDHAOMe **31/31'e** zu untersuchen. Wie die Ergebnisse der Stabilität zeigten, trat die Zersetzung besonders im Neutralen und Basischen, aber auch im Sauren binnen weniger Minuten ein. Dadurch könnten die Sättigungskonzentrationen der Ausgangsverbindungen nicht bestimmt werden. Aus eben diesem Grund wurde auch die Löslichkeit von BDHA **9e** im Basischen nicht bestimmt.

3.2.4.2.2 Durchführung

Zunächst wurde für jede zu untersuchende Verbindung eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0.25 μ M bis 2 mM (BDHA **9e**) bzw. 0.25 μ M bis 500 μ M (BDHA2OMe **30e**, BDHAAce **13d**) durch Lösen und Verdünnen der Substanzen in Acetonitril und Vermessen mittels

HPLC erstellt (siehe Kapitel 7.3.2). Für die Bestimmung der Löslichkeit wurde jeweils eine unlösliche Menge der Verbindungen BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** in 100 mM Phosphatpuffer der unterschiedlichen pH-Werte unter Schütteln suspendiert. Es wurde kontrolliert, ob ein Rückstand vorhanden war (siehe Kapitel 7.3.3). Nach Zentrifugation wurden die Überstände zunächst 1+1 und anschließend 1:100 mit Acetonitril (mit 1 % Ameisensäure im Falle von **9e**) verdünnt und die Lösungen *per* HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.3.4).

3.2.4.2.3 Ergebnisse

Die Löslichkeit von der unsubstituierten Verbindung BDHA **9e** erwies sich als sehr gut in sauren bis neutralen wässrigen Medien. Mit einer Sättigungskonzentration von 250-300 mM gab es keine Probleme, Inkubationsstudien durchzuführen. Die angegebene Konzentration entsprach einer Masse von 38.6-42.6 g pro Liter. Außerdem wirkte sich die sehr gute Löslichkeit positiv auf die Bioverfügbarkeit aus, da BDHA **9e** dadurch und durch seine gute Permeabilität, resultierend aus der hohen Lipophilie und der kleinen Molekülgröße, die eine passive Diffusion möglich macht, in die BCS-Klasse I des Biochemischen Klassifizierungssystems fiel (siehe Tabelle 1-1).³⁷

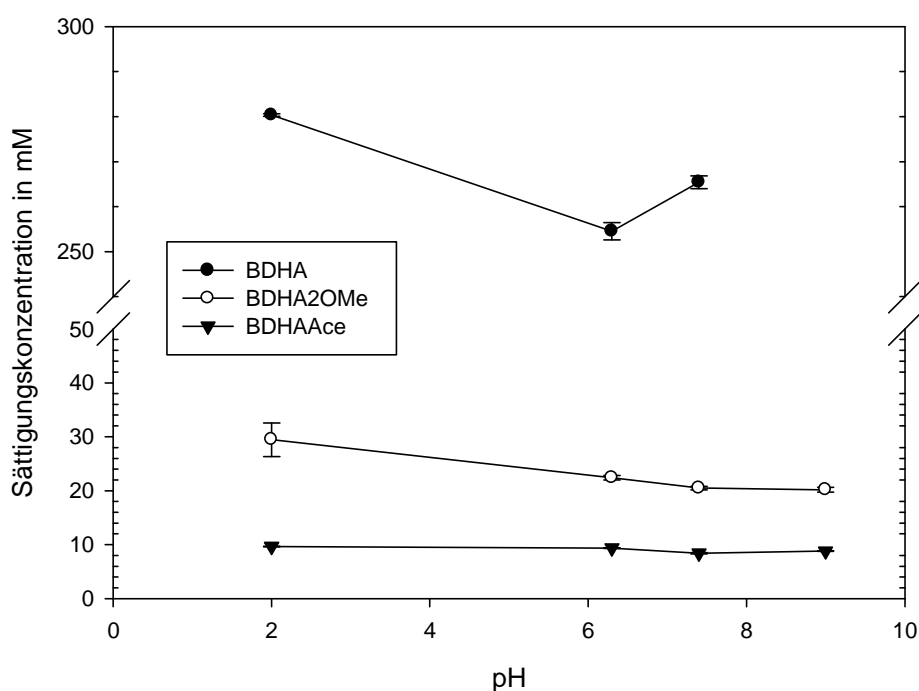


Abbildung 3-36 Vergleich der Löslichkeiten von BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** in 100 mM Phosphatpuffer der pH-Werte 2-9. Auf die Bestimmung der Sättigungskonzentration von BDHA **9e** bei pH 9 wurde aufgrund vorher nachgewiesener Instabilität im Basischen verzichtet (siehe Kapitel 3.2.4.1.3). Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Injektionen in die HPLC.

Die Löslichkeit von BDHA2OMe **30e** und auch von BDHAAce **13d** war ebenfalls als gut einzuschätzen, da sie mit 20-30 mM bzw. 10 mM immer noch deutlich im millimolaren Bereich lag. Diese Sättigungskonzentrationen entsprachen einer Masse von 3.6-5.4 g pro Liter für BDHA2OMe **30e** und 1.9 g pro Liter für BDHAAce **13d**. Eine derartig gute Löslichkeit war durch die sehr unpolar erscheinenden Verbindungen überraschend aber erfreulich. Durch die hohe Lipophilie der ebenfalls noch kleinen Moleküle konnten auch diese beiden Verbindungen in die BCS-Klasse I eingeordnet werden, wobei sie sich aber näher an der BCS-Klasse II mit einer schlechten Löslichkeit und guten

Permeabilität befanden als BDHA **9e**. Diese überzeugenden Eigenschaften trugen zu dem hohen Potenzial der Verbindungsklassen als Prodrugs von amidinhaltigen Arzneistoffen bei.

3.2.4.3 Berechnung der pK_a -Werte

Die pK_a -Werte der *O*-substituierten BDHAs **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27** und **28** wurden durch das Internetprogramm MarvinSketch berechnet.¹¹⁹ Die Diskussion der Ergebnisse ist im Vergleich zu den *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen (**9**) zusammenfassend in Kapitel 3.1.4.3 aufgeführt.

3.2.4.4 Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte

Die Lipophilie einiger *N,N'*-Dihydroxybenzamide **9**, **30**, **32** und **27** wurde flüssigchromatographisch bestimmt und mit den durch das Programm MarvinSketch berechneten Daten verglichen.¹¹⁹ Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse zusammenfassend in Kapitel 3.1.4.4 diskutiert.

3.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte erfolgreich eine Reihe *O*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamide **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27**, **28** und **33** hergestellt werden. Nur das *O*-Benzyl-*N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**10'e**) war literaturbekannt und wurde bereits von Ley *et al.* [1914] synthetisiert (siehe Kapitel 1.4, Abbildung 1-12).⁷⁶ Wie die Jahreszahl vermuten lässt, fehlt es in der Referenz an charakterisierenden spektroskopischen Daten. Auch das spontane Vorliegen des Tautomers **10e** wurde nicht diskutiert. Durch die erfolgreich durchgeführten Synthesen liegt nun eine Reihe neuer Verbindungen vor, welche mittels NMR, MS und IR charakterisiert wurden. Besonders das Prinzip der *O,O'*-Dimethylierung von Dihydroxybenzamidinen **30** ist als Prodrug-Konzept denkbar, während die Benzyl-, Tetrahydropyranyl-, TBDMS- und TBDPS-Reste vorwiegend als geeignete Schutzgruppen für Synthesen unter bestimmten Reaktionsbedingungen eingesetzt werden können. Die Synthese von *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) war nur unter Verwendung dieser Schutzgruppen möglich und untermauert deren Bedeutung durch das praktische Anwendungsbeispiel (siehe Kapitel 3.1.3, Abbildung 3-8).

Die Stabilitätsuntersuchungen ergaben, dass sich *O*-monosubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamide **31/31'** und **10/10'** als sehr labil in verschiedenen Lösungsmitteln und zum Teil auch in fester Form erwiesen. Alle *O,O'*-disubstituierten Derivate **30**, **32**, **27**, **28** und **33** zeigten eine deutlich bessere Stabilität in dünnschichtchromatographischen Vorversuchen, bei denen die Stabilität von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) deutlich die von *O*-unsubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **9** in wässrigen Medien überstieg. Aufgrund der Vorversuche kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse von **30e** im Wässrigen auf alle *O,O'*-disubstituierten BDHAs **30**, **32**, **27**, **28** und **33** übertragbar sind und somit deren Beständigkeiten den Stabilitäten von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **9** deutlich überlegen sind.

Die Löslichkeit von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) stellte sich sowohl im Säuren, als auch im Basischen mit einer Sättigungskonzentration von 30-20 mM als sehr hoch heraus (siehe Kapitel 3.2.4.2.3). Zwar ist die Löslichkeit von BDHA **9e** um das zehnfache höher, jedoch stellt eine erreichbare Konzentration im millimolaren Bereich im Wässrigen aus pharmazeutischer Sicht keine Nachteile dar. Durch die weiterhin gute Löslichkeit trotz hoher Lipophilie und der hohen Permeabilität durch das niedrige Molekulargewicht kann BDHA2OMe **30e** in die Klasse I des BCS

(siehe Kapitel 1.3.1, Tabelle 1-1) eingeordnet werden. Die Löslichkeit von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) kann allerdings nicht ohne Weiteres auf andere *O,O'*-disubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **32**, **27**, **28** und **33** übertragen werden. Die maximal erreichbare Konzentration der Verbindungen in Wasser hängt entscheidend von ihrer Lipophilie ab. Verbindungen mit großen hydrophoben „Resten“ wie benzyl-, TBDMS- und besonders TBDPS-substituierte Verbindungen sind voraussichtlich sehr schlecht wasserlöslich. Allerdings sollen diese Molekülgruppen auch nicht in Prodrugs Verwendung finden, sondern dienen der Schutzgruppenstrategie in der überwiegend in organischen Lösungsmitteln ablaufenden Synthese.¹³²

Die Berechnung der pK_a -Werte mit dem Programm MarvinSketch sollte eine Aussage über die Eigenschaften der Stickstoffatome der *O*-substituierten BDHAs **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27**, **28** und **33** als Basen erlauben.¹¹⁹ Je niedriger der Wert, desto unwahrscheinlicher ist eine Protonierung und somit das Vorliegen einer geladenen, nicht-permeablen Form des Moleküls. Die Substitution eines oder beider Sauerstoffatome der BDHAs führt zu einer Erhöhung des pK_a -Wertes um 1 bis 1.5 Einheiten auf etwa 4. Besitzt ein Medium den pH-Wert von 3 liegen unsubstituierte BDHAs **9** also weiterhin ungeladen vor, während die *O*-substituierten BDHAs **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27**, **28** und **33** eine positive Ladung annehmen. Im pH-Bereich von etwa 4.5-14, also auch unter physiologischen Bedingungen, liegen aber alle *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27**, **28** und **33** ungeladen vor und sind somit permeabel (siehe Kapitel 3.2.4.3).

Die Lipophilie einiger ausgewählter Verbindungen wurde experimentell bestimmt und zusätzlich mit dem Programm MarvinSketch berechnet.¹¹⁹ Im Vergleich zu *O*-unsubstituierten BDHAs **9** ist die Lipophilie der untersuchten *O,O'*-disubstituierten Verbindungen BDHA2OMe **30** und BDHA2OBn **32** um etwa 1.5 bis 4 log*D*-Einheiten erhöht (siehe Kapitel 3.2.4.4). Der Richtwert für gute Arzneistoffeigenschaften von Lipinsky mit einem anzustrebenden log*D*-Wert von unter 5 als Maß für die Lipophilie ist für die als Prodrug-Konzept in Frage kommenden *O,O'*-dimethylierten BDHAs **30** klar erfüllt. Die *O,O'*-dibenzylierten Dihydroxybenzamidine **32** erwiesen sich erwartungsgemäß als deutlich lipophiler. Trotzdem bleiben auch diese Verbindungen zumeist unter dem log*D*-Wert von 5 – nur *p*-Brom-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32f**) überschreitet diese Grenze bei experimenteller Bestimmung. Tendenziell stimmen die empirisch gewonnenen Daten mit den Berechneten überein, allerdings liegen die experimentell bestimmten log*D*-Werte in den meisten Fällen leicht über den berechneten Ergebnissen.¹⁴⁶ Dennoch scheint das Programm MarvinSketch geeignet zu sein, um die Lipophilie von Verbindungen abzuschätzen.

3.3 Synthese cyclischer *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

3.3.1 Einleitung

Da sich die *O,O'*-disubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **30**, **32**, **27**, **28** und **33** als sehr stabil erwiesen, sollte in der Hoffnung auf eine ebenfalls gute Stabilität versucht werden, cyclische Derivate **13** der Stoffklasse zu synthetisieren. Die Eigenschaften der erhaltenen cyclischen Dihydroxybenzamidine **13** waren zu charakterisieren und auf die Tauglichkeit als Prodrugs zu untersuchen. Angestrebt war eine gute Stabilität in wässrigen Medien, eine erhöhte Lipophilie, um die Permeation durch Biomembranen zu ermöglichen und eine rasche Metabolisierung zu Benzamidin (**15e**).

3.3.2 Synthesestrategien

In Anlehnung an Aitken *et al.* [1996] sollte ein Benzhydroxamsäurechlorid (**18**) mit einem Imin **65** unter Cyclisierung zur Reaktion gebracht werden, da diese Umsetzung in der Literatur mit verschiedenen Addukten gelang (siehe Abbildung 3-37).¹⁴⁷ Bisher wurden allerdings nur aliphatisch substituierte Imine **65** eingesetzt. Auf die gleiche Weise waren Umsetzungen mit geschützten sauerstoffs-substituierten Iminen geplant.

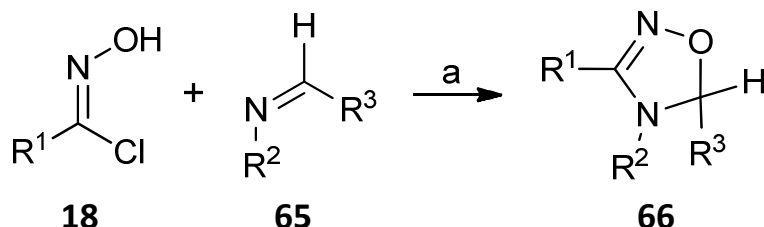


Abbildung 3-37 Die Cyclisierungsreaktion von einem Hydroxamsäurechlorid **18** mit einem Imin **65** führte nach Aitken *et al.* [1996] zu Oxadiazolen **66**. a: Triethylamin in Ether, 0-20 °C.

Eine Alternative stellte die Darstellung von weiteren cyclischen Dihydroxybenzamidinen ausgehend von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) dar. Durch die Synthese mit geeigneten Reagenzien in Anlehnung an die Reaktionen von aliphatischen Dialkoholen **67** mit Dimethoxypropan (DMP) nach Barili *et al.* [1986] oder mit Ketonen wie Aceton **68** nach He *et al.* [1992] sollte die Cyclisierung gelingen (siehe Abbildung 3-38).^{148,149}

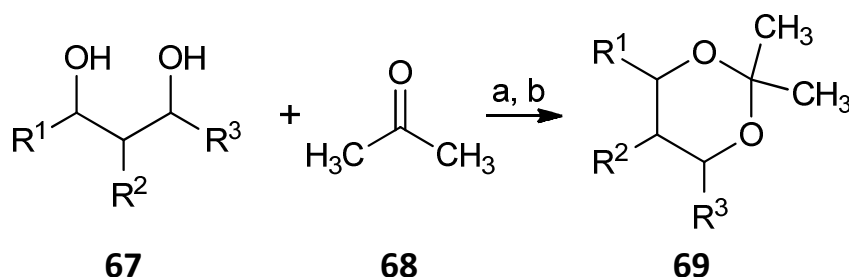


Abbildung 3-38 Die Cyclisierung von Dialkoholen **67** zu Isopropylidenen **69** gelang Barili *et al.* [1986] (a) und He *et al.* [1992] (b) mit Aceton **68**. a: Dimethylpyridin, Kat. *p*-Tosylsulfonsäure (TsOH); b: TsOH, rf. R^1 , R^2 und R^3 = aliphatische Reste.

Auf das Erhitzen unter Rückfluss und den Zusatz von Basen wie in der Literatur beschrieben musste aber aufgrund der bekannten Instabilität des BDHA **9e** gegenüber diesen Reaktionsbedingungen verzichtet werden. Es wurden bei der Synthese durch Ringschluss als Heterocyclen vorliegende *O,O'*-disubstituierte Dihydroxybenzamidine **70** erwartet. Allerdings waren auch andere Heterocyclen wie *N,O*-substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **13** als Reaktionsprodukte denkbar (siehe Abbildung 3-39). Außerdem sollte getestet werden, ob eine Umsetzung direkt aus dem Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) im Sinne einer „Tandem-Reaktion“ gelingt, in der BOxCl **18e** zuerst mit Hydroxylamin zu BDHA **9e** und anschließend im gleichen Ansatz mit einem Keton zu einem Heterocyclus **70** oder **13** reagiert (siehe Abbildung 3-39, b).

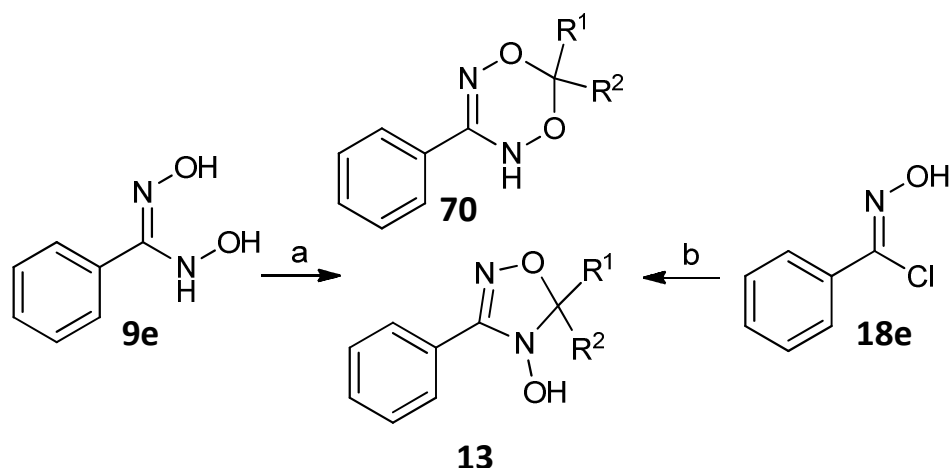


Abbildung 3-39 Die Synthese cyclischer Dihydroxybenzamidine sollte von BDHA **9e** oder von BOxCl **18e** ausgehen. Als Produkte waren 5-Ring-Heterocyclen **13** oder 6-Ring-Heterocyclen **70** denkbar. a: DMP oder Keton, 0 °C-RT; b: Keton, Hydroxylamin, 0 °C-RT.

3.3.3 Cyclische *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

In Anlehnung an Aitken *et al.* [1996] wurde *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) mit *O*-Methylbenzaldoxim (**71**) als Imin **65** umgesetzt (siehe Abbildung 3-37 und Abbildung 3-40).¹⁴⁷ Für die Reaktion musste zunächst das gewünschte Imin **71** synthetisiert werden, was nach einer Vorschrift von Gantt *et al.* [2011] ohne Probleme gelang (siehe Abbildung 3-40, a).¹⁵⁰

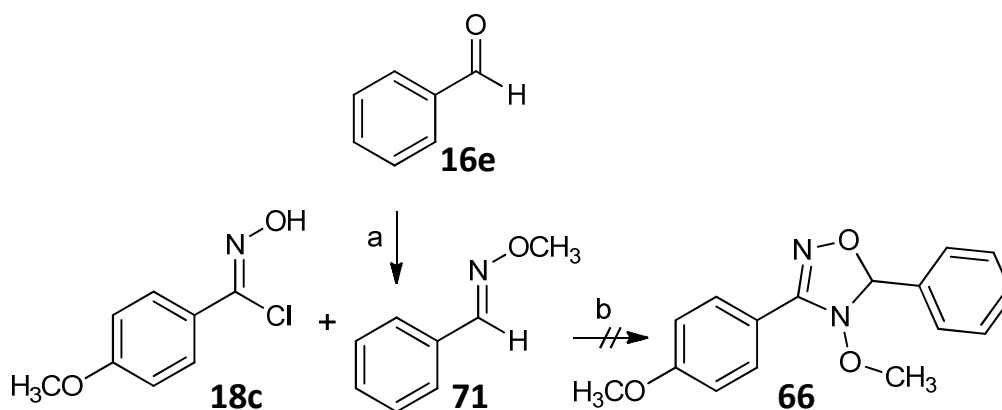


Abbildung 3-40 Die Reaktion von *p*OMe-BOxCl **18c** mit dem zuvor synthetisierten *O*-Methylbenzaldoxim (**71**) führte nicht wie erhofft zum Oxadiazol **66** als Reaktionsprodukt. a: *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid, Pyridin, DCM, 2 h RT; b: Triethylamin, Ether.

Die weitere Reaktion von *p*OMe-BOxCl **18c** mit dem erhaltenen Produkt **71** in Diethylether unter Zusatz von Pyridin führte nicht zu dem gesuchten 4-Methoxy-5-phenyl-3-(*p*-methoxyphenyl)-oxadiazol (**66**). Möglicherweise verhinderten die basischen Reaktionsbedingungen ein Gelingen der Synthese, obwohl dies unwahrscheinlich schien, da sich zweifach sauerstoffs substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine als stabil sowohl im Sauren als auch im Basischen erwiesen.

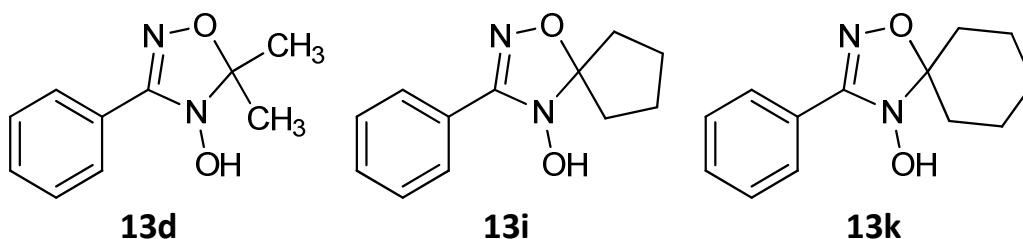


Abbildung 3-41 Es konnten verschiedene cyclische Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** aus *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) und entsprechenden Ketonen als Reagenz und Lösungsmittel gewonnen werden.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, cyclische Dihydroxybenzamidine nach Abbildung 3-39 aus Dihydroxybenzamidin **9e** oder Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) zu synthetisieren. Die Darstellung gelang am besten, indem die Ausgangsverbindung **9e** mit einem Keton als Reagenz und Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter Zusatz von Molekularsieb zur Reaktion gebracht wurde. Der Reaktionsansatz verfärbte sich im Verlauf der Umsetzung rosa, was die Entstehung eines unbekannten Nebenproduktes anzeigte. Die Produkte selbst waren farblos, wechselten aber nach dem Besprühen der DC-Platte mit Eisen(III)chloridlösung charakteristisch die Farbe zu rosa. Auch die Umsetzung im Sinne einer „Tandem-Reaktion“ ausgehend von Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) war möglich und führte mit Hydroxylamin und Aceton zu BDHAAce **13d**. Syntheseveruche mit dem Zusatz von katalytischen Mengen Tosylsulfonsäure funktionierten ebenfalls, boten aber keinen Vorteil. Auch der Einsatz von DMP als Reagenz anstelle von Aceton schien dünnschichtchromatographisch das Produkt BDHAAce **13d** zu liefern. Problematisch bei allen Umsetzungen war der schnelle Zerfall der Verbindungen **13** bei Überschreiten der Reaktionszeiten. War das Reaktionsgemisch nicht mehr charakteristisch gefärbt, konnte auch das gesuchte Produkt **13** nicht mehr nachgewiesen werden. Folglich gelangen bei vielen Versuchen nur wenige erfolgreiche Isolierungen der cyclischen Produkte **13d,i,k**. Besonders eine Überschreitung der Reaktionszeiten von etwa 5-12 Stunden war zu vermeiden. Eine weitere Eigenart stellte die nicht reproduzierbare Stabilität im NMR-Lösungsmittel DMSO- d_6 dar, in welchem es in einem Fall sehr stabil schien, bei einer weiteren Untersuchung aber schnell zerfiel. Ursächlich könnte ein geringer, nicht NMR-spektroskopisch messbarer Anteil einer Verunreinigung gewesen sein, welche die Probe zersetzte. Durch Umsetzungsversuche unter Lichtausschluss und Schutzgas konnten Licht oder Sauerstoff als mögliche zersetzende Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels Flashchromatographie. Die reinen Substanzen wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.4 Physikochemische Eigenschaften

3.3.4.1 Stabilitätsuntersuchungen

Zur vergleichenden Demonstration aller Ergebnisse sind die Untersuchungen zur Stabilität cyclischer Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** zusammenfassend in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben.

3.3.4.2 Bestimmung der Löslichkeit

Zur vergleichenden Demonstration der Ergebnisse sind die Untersuchungen zur Löslichkeit zusammenfassend in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben. Es wurde nur die Löslichkeit von BDHAAce **13d** bestimmt und mit BDHA **9e** und *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) verglichen.

3.3.4.3 Berechnung der pK_a -Werte

Die pK_a -Werte wurden durch das Internetprogramm MarvinSketch berechnet.¹¹⁹ Die Diskussion der Ergebnisse ist im Vergleich zu den *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **9** und *O*-substituierten BDHAs **31/31'**, **10/10'**, **30**, **32**, **27**, und **28** zusammenfassend in Kapitel 3.1.4.3 aufgeführt.

3.3.4.4 Vergleich berechneter und bestimmter $\log D$ -Werte

Die Lipophilie der cyclischen Dihydroxybenzamide **13d,i,k** wurde flüssigchromatographisch bestimmt und mit den durch das Programm MarvinSketch berechneten Daten verglichen.¹¹⁹ Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse zusammenfassend in Kapitel 3.1.4.4 diskutiert.

3.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten drei cyclische Dihydroxybenzamide **13d,i,k** erfolgreich durch Umsetzung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) mit entsprechenden Ketonen gewonnen werden, von denen 4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.4]non-2-en (**13i**) und 4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.5]dec-2-en (**13k**) nicht literaturbekannt waren. Man kann davon ausgehen, dass die Synthesemethode auch auf die Darstellung anderer Dihydroxybenzamide in Form von Oxadiazolen **13** übertragbar ist, indem andere Ketone als Reagenzien gewählt werden.

Die Stabilität des Oxadiazols **13d** erwies sich sowohl im sauren als auch im basischen Wässrigen als deutlich verbessert im Vergleich zum *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) und *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'e**), jedoch nicht im Vergleich zu BDHA2OMe **30** (siehe Kapitel 3.3.4.1). Es scheint hinsichtlich der Stabilität dennoch sinnvoll, auch cyclisierte Dihydroxybenzamide als Prodrugs einzusetzen.

Die Löslichkeit von 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (**13d**) ist der von BDHA **9e** deutlich unterlegen und etwa halb so groß wie die Löslichkeit von BDHA2OMe **30**. Trotzdem liegt sie noch im millimolaren Bereich und damit in einer von vielen auf dem Markt befindlichen Arzneistoffen angestrebten Größenordnung.

Das Programm MarvinSketch berechnete für alle synthetisierten Oxadiazole **13d,i,k** (siehe Abbildung 3-41) eine mögliche Deprotonierung des Sauerstoffatoms im stark Basischen. Es wurde keine Protonierung des Stickstoffatoms im pH-Bereich von 0-14 berechnet, wie es für alle anderen Dihydroxybenzamide der Fall war. Da das Prodrug-Prinzip in erster Linie dazu dient, die Basizität der Stickstoffatome herabzusetzen und sie damit schwerer protonierbar zu machen, ist das Ziel in dieser Hinsicht durch die cyclisierten Dihydroxybenzamide **13d,i,k** in vollem Umfang erreicht.

3.4 Synthese *O*-substituierter Benzamidoxime

3.4.1 Einleitung

Da die Metabolisierung und die Stabilität im Wässrigen von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (**13d**) bisher nicht untersucht wurden, war nicht bekannt, welche Metabolite bei den *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen entstehen würden. Damit alle möglichen Abbauprodukte in der HPLC detektiert

werden konnten, wurden entsprechende Standardverbindungen und deren zugehörige Retentionszeiten bei der verwendeten HPLC-Methode benötigt (siehe Abbildung 3-42). Aufgrund dessen sollten die erwarteten *O*-substituierten Amidoxime **72e** und **73** synthetisiert werden.

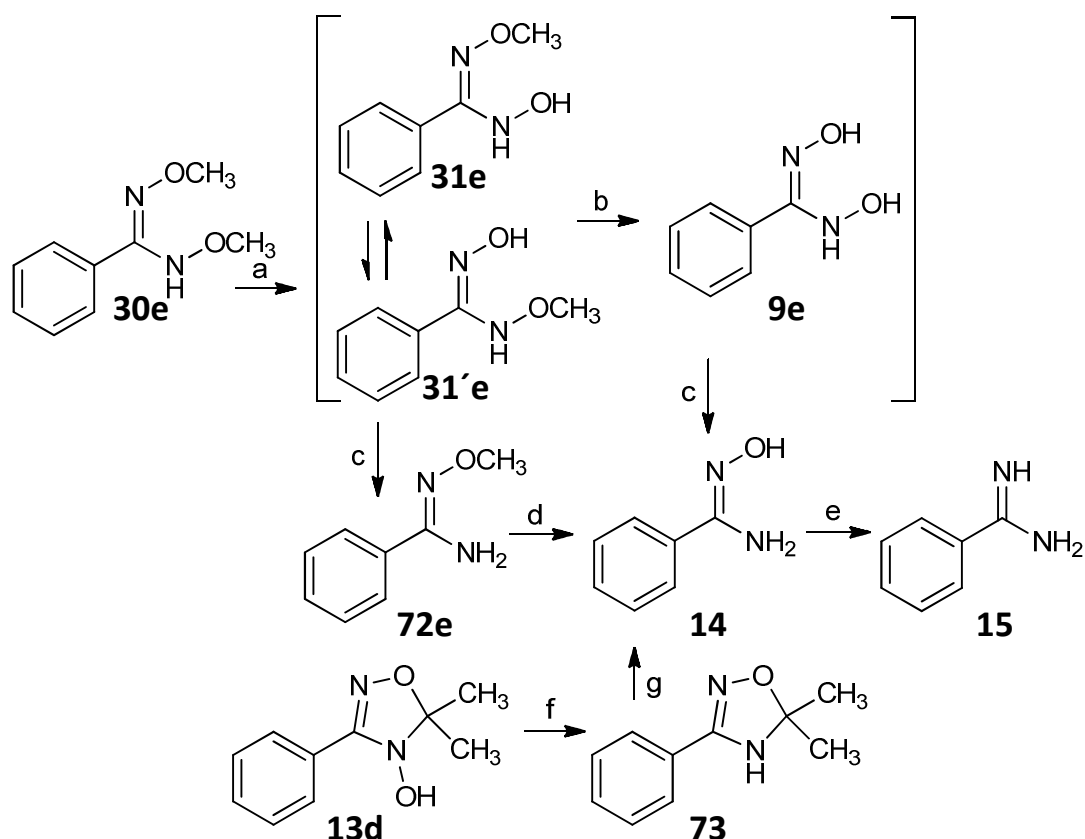


Abbildung 3-42 Die *O*-substituierten Amidoxime *O*-Methylbenzamidoxim (**72e**) und 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**73**) sind mögliche Zwischenstufen des Metabolismus von BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** zu Benzamidin (**15e**). a, d, g: oxidative Demethylierung vermutlich durch CYP450; b, c: spontaner Zerfall durch Instabilität bei pH 7.4 und enzymatische Reduktion durch das mARC-System; e: Reduktion durch das mARC-Enzymsystem.

Den *O*-substituierten Benzamidoximen **72e** und **73** gilt besonderes Interesse, da sie wie Benzamidoxim (**14**) im Wässrigen stabil sind und daher als detektierbare Zwischenstufen erwartet werden. Würden sie nicht als Metabolite detektiert, könnten die Abbauprodukte effektiv durch das eingesetzte Enzym abgebaut worden sein. Andernfalls wurde die Ausgangsverbindung eventuell nicht umgesetzt.

3.4.2 Synthesestrategie

Da die Verbindungen *O*-Methylbenzamidoxim (**72e**) und 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**73**) beide bereits literaturbekannt waren, sollten die Synthesen nach den entsprechenden Vorschriften ablaufen.

Die Darstellung von *O*-Methylbenzamidoxim (**72e**) war durch Methylierung von Benzamidoxim (**14**) mit Dimethylsulfat im Alkalischen in einer Vorschrift von Johnson *et al.* [1980] beschrieben (siehe Abbildung 3-43).¹⁵¹

Da die Verbindung BAOAce **73** als Nebenprodukt der Synthese von BDHAAce **13d** aus BDHA **9e** erwartet wurde, sollte die Darstellung zunächst auf diesem Weg getestet werden. Bei Misslingen dieser Reaktion konnte nach einer Literaturvorschrift von Lessel *et al.* [1993] vorgegangen werden, in der BAO **14** in Eisessig mit Aceton **68** umgesetzt wurde.¹⁵²

3.4.3 O-Substituierte Benzamidoxime

Die Synthese von O-Methylbenzamidoxim (**72e**) gelang nach Literaturvorschrift von Johnson *et al.* [1980] durch Methylierung von Benzamidoxim (**14**) in 0.7 N Natronlauge problemlos (siehe Abbildung 3-43).¹⁵¹ Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gradienten aufgereinigt.

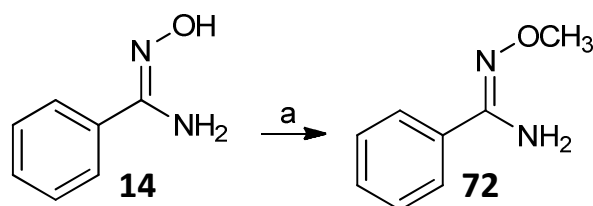


Abbildung 3-43 Die Synthese von O-Methylbenzamidoxim (**72e**) gelang nach einer Literaturvorschrift aus Benzamidoxim (**14**).¹⁵¹ a: Dimethylsulfat, Natronlauge, 0 °C, 6 h.

Anschließend wurde versucht, 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**73**) als Nebenprodukt aus der Synthese von BDHAAce **13d** aus BDHA **9e** zu isolieren (siehe Abbildung 3-44, a). Durch eine längere Reaktionsdauer und Zerfall des BDHAAce **13d** sollte hauptsächlich BAOAce **73** als Produkt entstehen. Dies gelang leider nicht. Massenspektrometrisch konnte die gesuchte Verbindung **73** nicht nachgewiesen werden.

Alternativ wurde die Synthese nach Lessel *et al.* [1993] durchgeführt, in der BAO **14** mit Aceton **68** in Eisessig reagieren sollte (siehe Abbildung 3-44, b).¹⁵² Der Reaktionsansatz wurde abgesaugt, mit Diisopropylether gewaschen und anschließend flashchromatographisch über Kieselgel mit einem Fließmittelgradienten aus Cyclohexan und Ethylacetat aufgereinigt. Das Produkt 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**73**) konnte in niedrigen Ausbeuten auf diese Weise gewonnen werden.

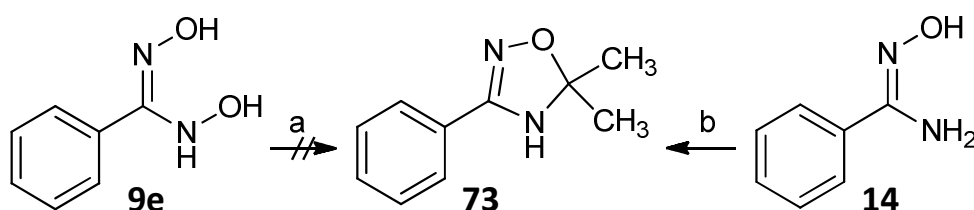


Abbildung 3-44 Bei der Synthese von BDHAAce **13d** sollte BAOAce **73** als Nebenprodukt anfallen, konnte aber nicht isoliert werden (a). Stattdessen gelang die Darstellung von 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,5-oxadiazol (**73**) aus BAO **14** nach Literaturvorschrift (b).¹⁵² a: Aceton **68**, RT; b: Aceton, Eisessig.

3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

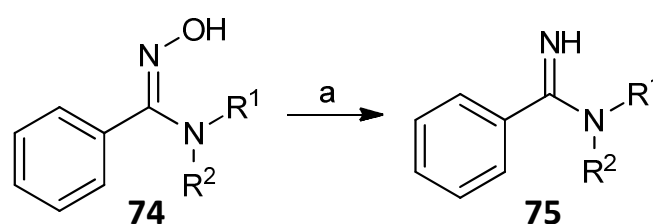
Die für die geplanten Inkubationsstudien und *in vivo*-Untersuchungen benötigten O-substituierten Benzamidoxime **72e** und **73** als mögliche Metabolite oder Instabilitätsprodukte von O,O'-Dimethyl-N,N'-dihydroxybenzamidin (**30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxa-

diazol (**13d**) konnten erfolgreich synthetisiert werden und stehen für eine Charakterisierung mittels HPLC zur Verfügung. Da für Untersuchungen von Substanzen mittels HPLC aufgrund der niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenze generell nur wenig Substanzmenge benötigt wird, sind die Resultate der Synthese für diesen Zweck ausreichend.

3.5 Synthese *N*-substituierter Benzamidoxime

3.5.1 Einleitung

Um zu untersuchen, welchen Einfluss verschiedene *N*-Substituenten am Benzamidoxim **74** auf die Reduktion zum entsprechenden *N*-substituierten Benzamidin **75** durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem besitzen, mussten einige Ausgangsverbindungen zunächst synthetisiert werden (siehe Abbildung 3-45).



Bezeichnung BAO	Bezeichnung BA	R ¹	R ²
14 (BAO)	15 (BA)	H	H
74a (BAONMe)	75a (BANMe)	Me	H
74b (BAOPh)	75b (BAPh)	Ph	H
74c (BAO2NMe)	75c (BA2NMe)	Me	Me
74d (BAOPip)	75d (BAPip)	-(CH ₂) ₅ -	
74e (BAOPhMe)	75e (BAPhMe)	Ph	Me

Abbildung 3-45 Der Einfluss verschiedener *N*-Substituenten auf die Reduktion der Benzamidoxime **74** zu den zugehörigen Benzamidinen **75** durch das mARC-System (a) sollte untersucht werden, wofür einige Derivate zuvor synthetisiert werden mussten.

3.5.2 Synthesestrategie

Da *N*-Methylbenzamidoxim (BAONMe **74a**) bereits literaturbekannt war, sollte die Verbindung nach der Vorschrift von Thipyapong *et al.* [2011] synthetisiert werden, indem Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) mit Methylamin (MeAmin **76a**) und Triethylamin in Ether zur Reaktion gebracht werden sollte (siehe Abbildung 3-46). Nach Extraktion mit Chloroform gegen Wasser könnte das Produkt **74a** aus Hexan auskristallisiert werden.¹⁵³

Die Synthese von *N*-Phenylbenzamidoxim (BAOPh **74b**) sollte nach einer Patentvorschrift von Sielecki-Dzurdz *et al.* [2010] durchgeführt werden.¹⁵⁴ Dafür wurde BOxCl **18e** in wasserfreiem Ether unter Argon-Begasung gelöst und nacheinander Anilin (PhAmin **76b**) und Triethylamin hinzugegeben (siehe Abbildung 3-46). Nach etwa drei Tagen Rühren bei Raumtemperatur konnte die Reaktion abgeschlossen sein.

N,N'-Dimethylbenzamidoxim (BAO2NMe **74c**) sollte nach einer Literaturvorschrift von Gozlan *et al.* [1977] aus BOxCl **18e** und Dimethylamin (**76c**, DiMeAmin) in Benzol bei 0 °C durchgeführt werden (siehe Abbildung 3-46).¹⁵⁵ Nach Abfiltrieren der entstandenen unlöslichen Nebenprodukte und Evaporation des Lösungsmittels konnte eventuell noch vorhandene Ausgangsverbindung **10e** mit Cyclohexan herausgewaschen werden.

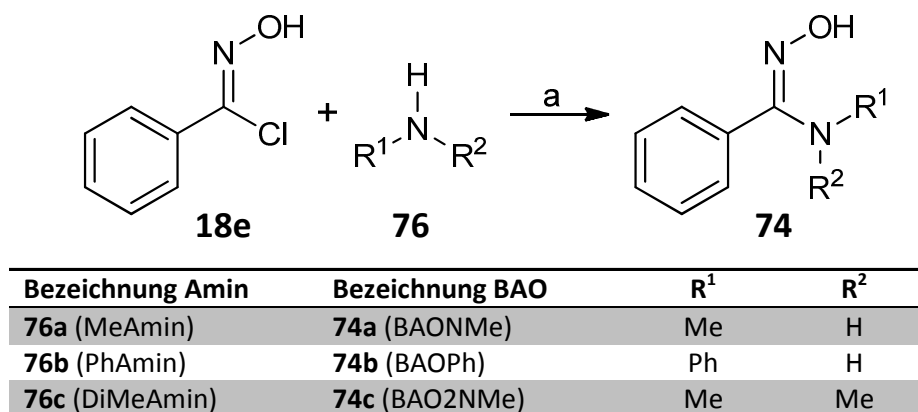


Abbildung 3-46 Die Synthesen der nicht vorliegenden Benzamidoxim-Ausgangsverbindungen **74** sollten nach unterschiedlichen Literaturvorschriften (a) aus Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) und Aminen **76** verlaufen.

3.5.3 *N*-Substituierte Benzamidoxime

Die Synthese von BAONMe **74a** wurde in Anlehnung an Thipyapong *et al.* [2011] durchgeführt (siehe Abbildung 3-46).¹⁵³ Da nur wässrige Methylaminlösung **76a** verfügbar war, wurde die Reaktion mit Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) und Triethylamin bei 0 °C anstelle von Diethylether in Ethanol durchgeführt. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise evaporiert und Wasser zu dem wässrigen Rückstand gegeben. Die dreimalige Extraktion erfolgte mit Dichlormethan statt Chloroform. Nach Waschen und Trocknen der vereinigten organischen Phasen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Hexan ausgefällt und über Nacht im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht.

BAOPh **74b** wurde in Anlehnung an die Patentvorschrift von Sielecki-Dzurdz *et al.* [2010] durchgeführt, indem BOxCl **18e** in Diethylether gelöst und mit Anilin **76b** und Triethylamin versetzt wurde (siehe Abbildung 3-46).¹⁵⁴ Auf das vorherige Trocknen des Lösungsmittels und die Verwendung von Schutzgas wurde verzichtet. Die Reaktion wurde nach einem Tag abgebrochen, indem das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand mit Wasser versetzt wurde. Nach Dichlormethan-Extraktion gegen Wasser konnte der Rückstand der organischen Phase mittels Flashchromatographie aufgereinigt werden und lieferte das Produkt *N*-Phenylbenzamidoxim (**74b**).

Die Synthese von BAO2NMe **74c** erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von Gozlan *et al.* [1977] aus BOxCl **18e** und DiMeAmin **76c** (siehe Abbildung 3-46).¹⁵⁵ Zur Vermeidung des giftigen Lösungsmittels Benzol wurde die Reaktion in einem Gemisch aus Ethanol und Ether bei 0 °C durchgeführt. Nach einem Tag wurde der entstandene Dimethylaminhydrochlorid-Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Versuch einer Umkristallisation in Ethanol nach Quadrelli *et al.* [1997] war nicht erfolgreich.¹⁵⁶ Ebenso wenig gelang die Ausfällung des Rohproduktes **74c** mit anschließender Kristallisation in Hexan analog zur Synthese von *N*-Methyl-

benzamidoxim (**74a**) nach Thipyapong *et al.* [2011].¹⁵³ Die Aufreinigung mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gradienten lieferte ein unreines Produkt. Auch eine zusätzliche Flashchromatographie mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten war nur wenig zufriedenstellend.

Aufgrund dessen wurde die Synthese nach Plapinger *et al.* [1956] leicht abgewandelt.¹⁵⁷ Die Reaktion wurde in absolutem Diethylether und Ethanol bei 0 °C bis Raumtemperatur über zwei Tage durchgeführt. Nach Abfiltrieren des Niederschlags wurde etwas Ether evaporiert und das ausfallende Produkt **74c** abgesaugt. Der Durchgang kristallisierte ebenfalls über Nacht in Ethanol und wurde abgesaugt. Als ebenfalls schwerlösliches Nebenprodukt der Synthese entstand das Dimer **64**, welches nur durch zusätzliche Flashchromatographie mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten entfernt werden konnte.

3.5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die *N*-substituierten Benzamidoxim-Derivate BAOPip **74d** und BAOPhMe **74d** sowie alle entsprechenden *N*-substituierten Benzamidine **75a-e** als mögliche Metabolisierungsprodukte lagen noch aus früheren Synthesen vor und wurden mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie auf Identität und Reinheit überprüft. Eine Nachsynthese war hierfür nicht nötig.

Die Verbindungen *N*-Methylbenzamidoxim (**74a**), *N*-Phenylbenzamidoxim (**74b**) und *N,N*-Dimethylbenzamidoxim (**74c**) konnten erfolgreich in Anlehnung an Literaturvorschriften synthetisiert werden. Die Verbindungen stehen somit für die Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Substituenten am Amidoxim-Stickstoffatom auf die Metabolisierung von Benzamidoximen **74** zur Verfügung (siehe Kapitel 5.4).

3.6 Synthese von Bis(*N,N'*-dihydroxy)furamidin

3.6.1 Einleitung

Neben dem bereits von Hungeling [2009] synthetisierten Tetrahydroxy-Pentamidin **12** (siehe Abbildung 1-14) sollte ein weiteres antiparasitisches Tetrahydroxy-Prodrug synthetisiert werden, um dessen Wirksamkeit mit der eines Ester-Prodrugs vergleichen zu können.⁷⁰

3.6.2 Synthesestrategie

Die Synthese sollte nach der entwickelten Methode zur Darstellung verschiedener *para*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**9b-g**) verlaufen (siehe Abbildung 3-2, Kapitel 3.1.3).¹⁵⁸ Der dafür benötigte Aldehyd **77** als Ausgangsverbindung sollte im ersten Schritt in Anlehnung an die 2,5-Bis(*p*-cyanophenyl)furan-Synthese von Fu *et al.* [2011] aus *p*Br-BAlD **16f** dargestellt werden.¹⁵⁹

3.6.3 2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan-bis-*N,N'*-dihydroxyamidin

Die Kopplung der beiden *para*-Brom-substituierten Aromaten **16f** an den Furan-Ring gelang analog zur literaturbeschriebenen Synthese von 2,5-Bis(*p*-cyanophenyl)furan mit Palladium(II)acetat als Katalysator und Zusatz von Kaliumacetat in DMAc bei 130 °C über etwa 12 Stunden (siehe Abbildung 3-47). Die Aufreinigung des fluoreszierenden Rohproduktes **77** erfolgte ebenfalls mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit einem Gradienten aus Cyclohexan und Ethylacetat.

Im nächsten Schritt wurde der Dialdehyd **77** nach der etablierten Synthese mit Hydroxylaminhydrochlorid und Kaliumcarbonat in einem Ethanol/Wasser-Gemisch umgesetzt. Da die Ausgangsverbindung **77** nicht löslich in Ethanol war, gelang die Reaktion nicht wie üblich bei Raumtemperatur. Nach Erhitzen für eine Stunde auf 60 °C konnte das Furamidin-Dioxim **78** jedoch ohne weitere Aufreinigung quantitativ und mit hoher Reinheit gewonnen werden (siehe Abbildung 3-47).

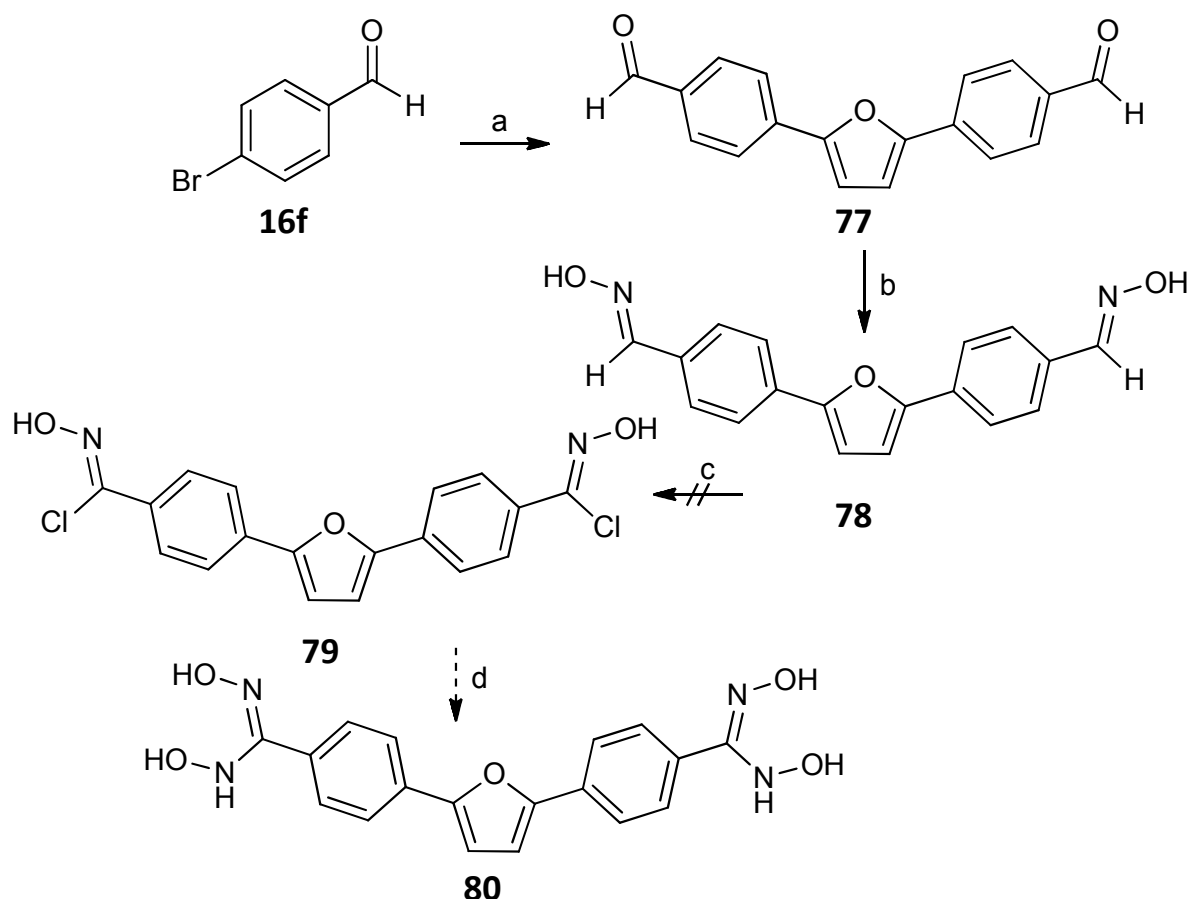


Abbildung 3-47 Die Synthese von Tetrahydroxy-Furamidin **80** verlief bis zur Stufe des Furamidin-Dioxims **78** nach Plan. Die Chlorierung zum entsprechenden Dihydroxamsäurechlorid **79** gelang allerdings nicht, weswegen das Synthesziel **80** nicht erreicht wurde. a: Furan, Pd(OAc)₂, KOAc, DMAc, 130 °C, 12 h; b: Hydroxylaminhydrochlorid, Kaliumcarbonat, EtOH/Wasser, 60 °C, 1 h; c: NCS 26, DMF, RT, 12 h oder CBCA 24, DCM, RT, 2 h; d: Hydroxylamin, EtOH, RT, 5 h.

Für die Darstellung des Furamidin-Dihydroxamsäurechlorids **79** wurde das Oxim **78** mit NCS **26** in DMF bei Raumtemperatur umgesetzt (siehe Abbildung 3-47). Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte nicht die gewohnte Entstehung eines Produktes, welches sich mit Eisen(III)chloridlösung nach Erhitzen braun verfärbte, sondern die Bildung vieler Produkte ohne diese charakteristische Reaktion. Dies deutete darauf hin, dass der Aromat durch den Furan-Ring stark aktiviert war, was die Möglichkeiten der Nebenreaktionen erhöhte. Auch der Furan-Ring selbst war sehr elektronenreich und konnte folglich Ziel einer Chlorierung gewesen sein. Massenspektrometrisch wurde das Produkt **79** nicht nachgewiesen.

Aufgrund dessen wurde das alternative Chlorierungsreagenz CBCA **24** getestet, welches einen Vorteil bei aktivierten, zu Nebenreaktionen neigenden Aromaten besitzen sollte. Auch bei dieser Reaktion in Dichlormethan konnte 2,5-Bis(phenyl)furan-bis-4-hydroxamsäurechlorid **79** nicht als eines der vielen

Produkte nachgewiesen werden. Die chromatographische Trennung der einzelnen entstandenen Verbindungen wurde als nicht sinnvoll eingeschätzt, da die Produkte in unterschiedlichsten Fließmittelgemischen sehr nah beieinander lagen und kein Hauptprodukt erkennbar war.

Da nicht alle entstandenen Substanzen der Chlorierung identifiziert werden konnten und eine chromatographische Trennung an dieser Stelle nicht möglich war, wurde das Produktgemisch ohne Aufreinigung mit Hydroxylamin in Ethanol umgesetzt und beobachtet, ob die sehr empfindliche Blaufärbung mit Eisen(III)chloridlösung die Entstehung eines Dihydroxybenzamidins anzeigte (siehe Abbildung 3-47).¹⁵⁸ Das Tetrahydroxy-Furamidin **80** konnte aber auch auf diesem Weg nicht nachgewiesen werden.

3.6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Leider konnte Tetrahydroxy-Furamidin **80** nicht synthetisiert werden. Der kritische Schritt der Chlorierung gelang auch mit unterschiedlichen Reagenzien nicht. Wahrscheinlich ist der Aromat durch den sauerstoffhaltigen Furan-Rest in *para*-Position stark aktiviert und elektronenreich, was Nebenreaktionen mit einem oder beiden Aromaten begünstigt. Des Weiteren steht auch der Furan-Ring selbst mit den enthaltenen Doppelbindungen für Reaktionen zur Verfügung, was die Zahl möglicher Chlorierungsprodukte ebenfalls erhöht. Die Chlorierung der Oxim-Funktionen erfolgt offensichtlich benachteiligt gegenüber der Chlorierung von aromatischen Strukturen.

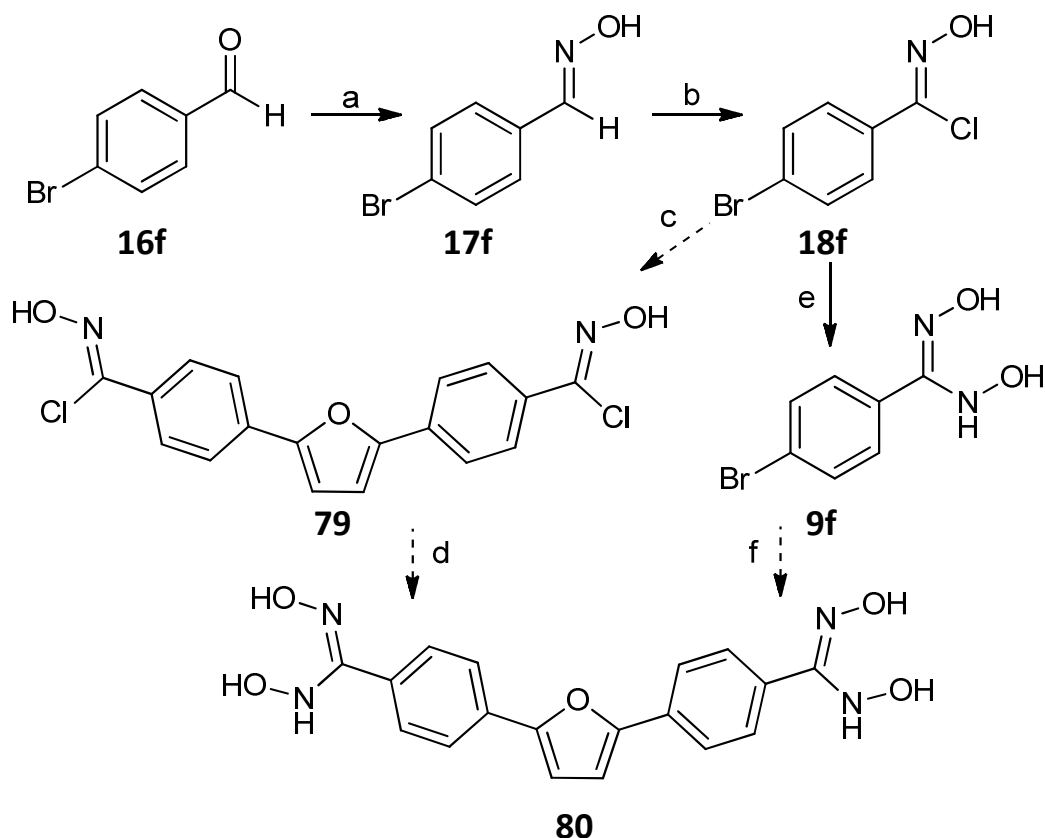


Abbildung 3-48 Die denkbare späte Kopplung der *p*-Brom-Aromaten **18f** und **9f** an Furan wird durch die nötige hohe Reaktionstemperatur über lange Zeit, bei der das Hydroxamsäurechlorid **79** und das Dihydroxybenzamidine **9f** nicht stabil sind, verhindert. a: Hydroxylaminhydrochlorid, Kaliumcarbonat, EtOH/Wasser, RT, 2 h; b: NCS 26, DMF, RT, 12 h; c, f: Furan, Pd(OAc)₂, KOAc, DMAc, 150 °C, 12 h; d, e: Hydroxylamin, EtOH, RT, 5 h.

Die Synthese auf einem alternativen Reaktionsweg durch eine spätere Kopplung der Vorstufen **18f** oder **9f** scheint für das Furamidin ungeeignet, da für die Kopplung an den Furan-Ring stets sehr hohe Temperaturen notwendig sind, welche von Benzhydroxamsäurechloriden **18,79** und erst recht von Dihydroxybenzamidinen **9** nicht vertragen werden (siehe Abbildung 3-48). Weitere Anstrengungen zur Darstellung von Tetrahydroxy-Furamidin **80** sollten sich auf alternative selektive Chlorierungsmöglichkeiten von Oximen fokussieren.

3.7 Synthese von heterocyclischen Pentamidin-Analoga

3.7.1 Einleitung

Da die Synthese des Tetrahydroxy-Furamidins **80** nicht gelang, sollte ein weiterer antiprotozoischer Wirkstoff in Form eines Prodrugs mit Dihydroxyamidin-Funktionen dargestellt werden. Dafür bot sich ein heterocyclisches Pentamidinanalogon an. Als Vergleichsverbindung war ein entsprechendes Succinyl-Prodrug geplant. Die wirksamen Verbindungen sind auch in diesem Fall die Diamidine.

3.7.2 Synthesestrategien

Für die Synthese von 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-*N*-(3-carboxypropionyloxy)amidinopyridin (PentaPySucc **84**) sollte zunächst das Intermediat 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-cyanopyridin (PentaPyCN **82**) nach Bakunova *et al.* [2009] aus 2-Brom-5-cyanopyridin (**81**) mit Natriumhydrid

dargestellt werden.¹⁵ Anschließend war die Umsetzung des Dinitrils **82** analog zur Synthese von Bissuccinyl-Pentamidin (BSP) geplant. Dafür sollte **82** mit Hydroxylamin zum entsprechenden Amidoxim PentaPyAO **83** reagieren, welches anschließend mit Bernsteinsäureanhydrid zum Bissuccinyl-Derivat **84** umgesetzt werden könnte (siehe Abbildung 3-49).¹⁶⁰

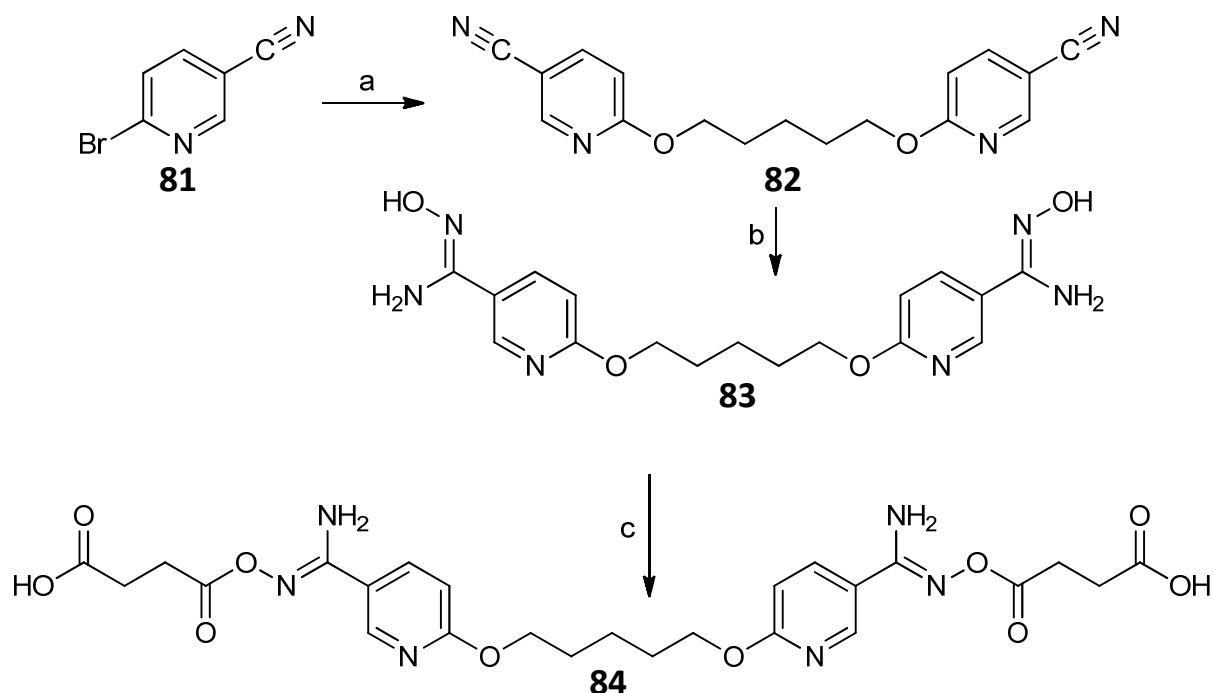


Abbildung 3-49 Die Synthese des Bissuccinyl-Derivates **84** sollte nach bekanntem Reaktionsschema aus 2-Brom-5-cyanopyridin (**81**) gelingen. a: NaH, THF, 0 °C; b: NH₂OH, EtOH, rf; c: Bernsteinsäureanhydrid, EtOH, DCM, rf, 3 h.

Die Synthese von 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-*N,N'*-dihydroxyamidinopyridin (PentyPyDHA **87**) sollte analog zur Synthese von Tetrahydroxy-Pentamidin **12** verlaufen.⁷⁰ Dafür war im ersten Schritt die Kopplung zweier 2-Hydroxy-5-formylpyridinmoleküle **85** mit 1,5-Dibrompentan zu 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-formylpyridin (PentaPyAld **86**) nach der klassischen Williamson Ethersynthese geplant (siehe Abbildung 3-50, a).¹²⁷ Die weitere Umsetzung sollte nach der bereits etablierten Methode zur Darstellung von Dihydroxybenzamidinen aus Aldehyden über die entsprechenden Oxime und Hydroxamsäurechloride verlaufen und das wirksame Endprodukt PentaPyDHA **87** liefern (siehe Abbildung 3-50, b und Kapitel 3.1).

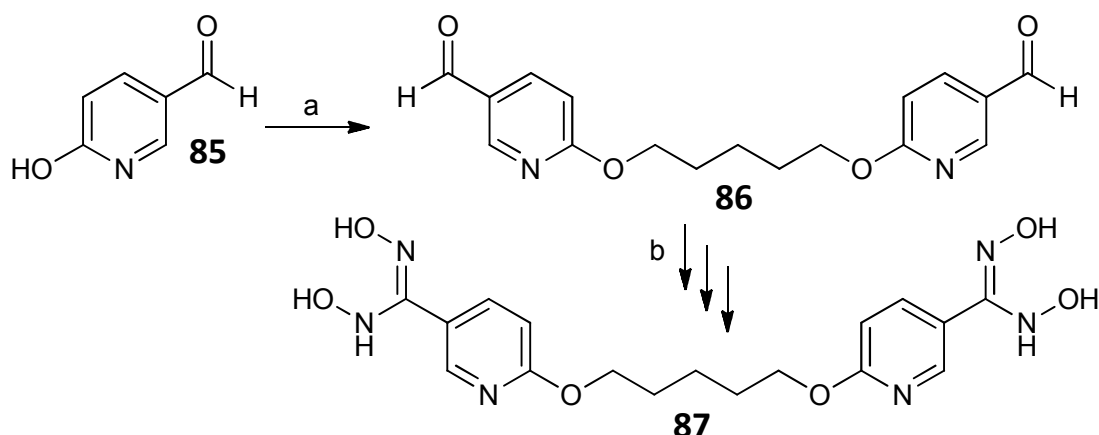


Abbildung 3-50 Die Synthese von PentyPyDHA 87 könnte über die klassische Williamson Ethersynthese mit 1,5-Dibrom-pentan verlaufen (a). Die weiteren Reaktionsschritte (b) sollten nach dem etablierten Syntheseweg zur Darstellung von Dihydroxybenzamidinen gelingen.

3.7.3 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-(3-carboxypropinyloxy)-amidinopyridin

Für den ersten Reaktionsschritt wurde nach der Literaturvorschrift von Bakunova *et al.* [2009] 1,5-Pentandiol in trockenem THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Natriumhydrid wurde 20 Minuten gerührt und 2-Brom-5-cyanopyridin, vorgelöst in Tetrahydrofuran, langsam zugetropft. Der Ansatz rührte einen Tag bei Raumtemperatur und lieferte das Zwischenprodukt PentaPyCN 82. Dieses wurde mit Hydroxylamin in Ethanol gekocht, wodurch das Amidoxim 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-*N*-hydroxyamidinopyridin (PentyPyAO 83) entstand. Das Intermediat 83 wurde auf bekannte Weise mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und lieferte die Bissuccinyl-Verbindung 84 (siehe Synthesestrategie Abbildung 3-49).¹⁶⁰

3.7.4 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-*N,N'*-dihydroxyamidinopyridin

Die Kopplung des 2-Hydroxy-5-formylpyridinmoleküls 85 mit 1,5-Dibrompentan unter Zusatz einer Base nach der klassischen Williamson Ethersynthese gelang leider nicht. Mittels DC wurde eine Vielzahl von Produkten nachgewiesen. Die Massenspektrometrie des Rohproduktes bestätigte die Entstehung mehrerer Verbindungen. In Spuren konnte auch das gesuchte Intermediat 86 detektiert werden, jedoch war eine Isolierung wegen der sehr niedrigen Ausbeute und der schlechten Trennbarkeit von den Nebenprodukten nicht sinnvoll.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde ein weiterer Synthesepan entwickelt (siehe Abbildung 3-51).

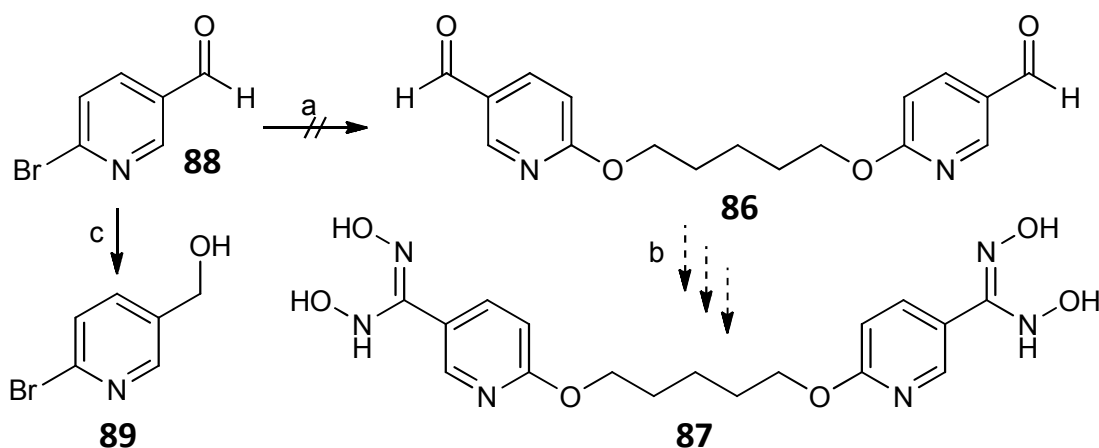


Abbildung 3-51 Die Synthese des Intermediats PentaPyAld 86 aus 2-Brom-5-formylpyridin (88) in Anlehnung an die literaturbeschriebene Darstellung des entsprechenden Dinitrils war nicht erfolgreich.¹⁵ a: NaH, THF, 0 °C, 1 d; b: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ / Na_2CO_3 , NCS 26, NH_2OH ; c: unerwünschte Nebenreaktion zu 2-Brom-5-hydroxymethylpyridin (89) durch Reduktion des Aldehyds 88 mit NaH.

Zunächst wurde 1,5-Pentandiol in trockenem THF gelöst, auf 0 °C abgekühlt und Natriumhydrid (als 60 %ige Dispersion in Mineralöl) hinzugefügt. Nach 20 Minuten wurde die Ausgangsverbindung 88, vorgelöst in trockenem THF, in einer Portion zugegeben und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt.¹⁵ Massenspektrometrisch konnte 2-Brom-5-hydroxymethylpyridin (89) als unerwünschtes Reduktionsprodukt nachgewiesen werden. Offensichtlich reagierte die Aldehydfunktion von 88 bevorzugt mit Natriumhydrid, welches hingegen als Base eingesetzt wurde, um die OH-Gruppen von 1,5-Pentandiol zu deprotonieren. Eine gekoppelte Verbindung 86 entstand nicht.

Weil die analoge Synthese von 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-cyanopyridin (82) aber literaturbeschrieben war und gelang, sollte das benötigte Intermediat PentaPyAld 86 durch Reduktion des Dinitrils 82 gewonnen werden (siehe Abbildung 3-52).¹⁵

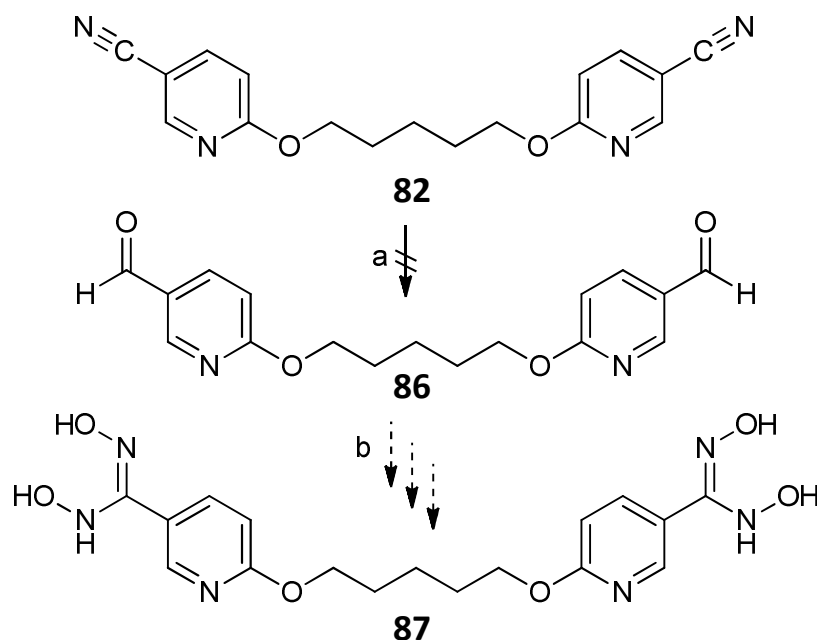


Abbildung 3-52 Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des Intermediats **86** bestand in der Reduktion des bereits synthetisierten Dinitrils **82** mit DIBAL-H (a). Die weiteren Reaktionsschritte (b) sollten mit Hydroxylaminhydrochlorid, NCS 26 und Hydroxylamin nach bekanntem Schema erfolgen.

Dazu wurde 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-cyanopyridin (**82**) in Anlehnung an eine allgemeine Synthese von Raap *et al.* [1999] in Dichlormethan gelöst und auf -70 °C abgekühlt.¹⁶¹ Zu der Lösung wurden langsam 1.1 Äquivalente einer 1 M Lösung aus Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) in Hexan getropft. Der Ansatz durfte sich über einen Zeitraum von einer Stunde auf -40 °C erwärmen. Zur Hydrolyse der Zwischenprodukte wurde ein homogenes Gemisch aus Kieselgel und Wasser zu dem Ansatz gegeben. Nachdem das Gemisch sich auf 0 °C erwärmt hatte, wurde eine Stunde bei gleichbleibender Temperatur gerührt und Kaliumcarbonat und Natriumsulfat hinzugegeben. Alle Feststoffe wurden durch Filtration entfernt und der Rückstand sorgfältig mit Dichlormethan und Diethylether gewaschen. Dünnschichtchromatographisch wurde keine quantitative Umsetzung nachgewiesen. Der gesuchte Dialdehyd **86** konnte massenspektrometrisch detektiert werden, jedoch lieferte die Säulenchromatographie nicht das gewünschte Produkt **86**. Eine weitere Umsetzung zum Tetrahydroxy-Derivat **87** konnte somit nicht realisiert werden (siehe Abbildung 3-52).

3.7.5 Zusammenfassung

Die Synthese des 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-N-(3-carboxypropionyloxy)amidinopyridins (**84**) verlief erfolgreich analog zur Darstellung bekannter Succinylesterprodrugs wie etwa BSP. Im Gegensatz dazu konnte das Tetrahydroxy-Prodrug 2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-N,N'-dihydroxyamidinopyridin (PentyPyBDHA **87**) nicht hergestellt werden, da schon die benötigte Ausgangsverbindung, der Dialdehyd **86**, nicht darstellbar war. Aus diesem Grund war es nicht möglich zu testen, ob der etablierte Syntheseweg zur Darstellung von Dihydroxybenzamidinen auf dieses Antiparasitikum übertragbar ist.

3.8 Synthese von Bis(*N,N'*-dihydroxy)diminazen

3.8.1 Einleitung

Da die Synthese des Tetrahydroxy-Furamidins **80** nicht erfolgreich verlief, sollte das Tetrahydroxy-Prodrug von Diminazen **92** als antiparasitärer Arzneistoff synthetisiert werden. Auch hier sollten die bisher gewonnenen Erkenntnisse für Synthesen von Dihydroxybenzamidinen Anwendung finden. Die Verbindung sollte mit dem entsprechenden Bissuccinyl-Diminazen verglichen werden, welches bereits von Hungeling *et al.* [2007] synthetisiert wurde.⁷⁰

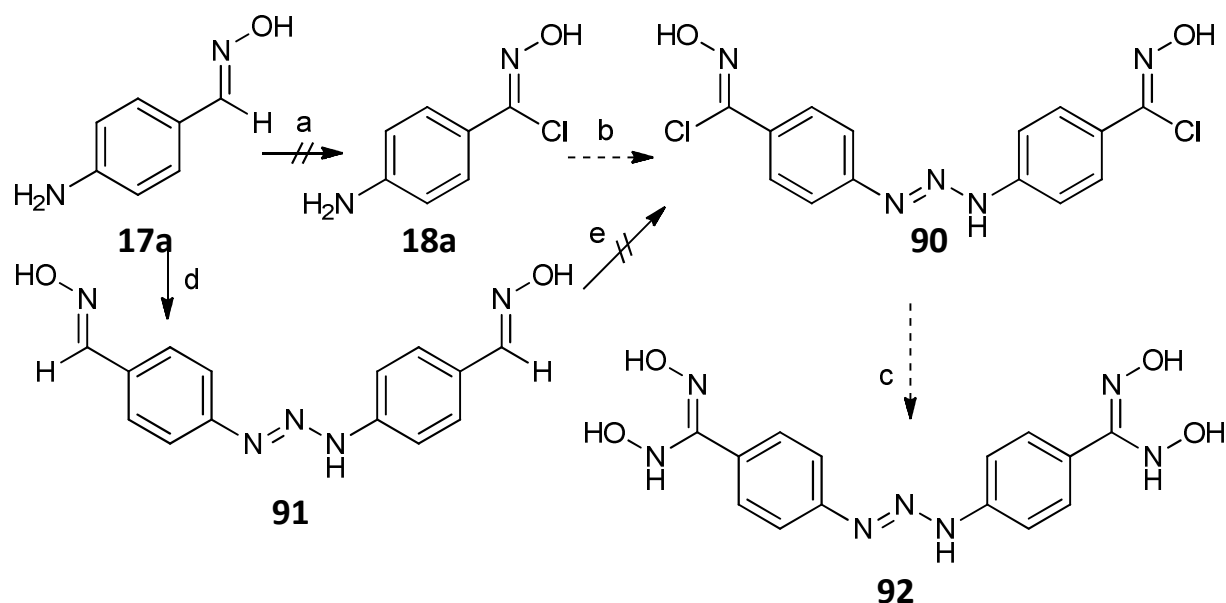


Abbildung 3-53 Die Synthese von Tetrahydroxy-Diminazen **92** kann nicht von den *p*-aminosubstituierten Benzhydroxamsäurechloriden **18a** und **90** ausgehen, da diese Verbindungen sich in der Vergangenheit als nicht darstellbar erwiesen (siehe Kapitel 3.1.3). a, e: NCS 26, DMF, RT, 12 h; b, d: NaNO₂, verd. HCl, NaOAc, 0 °C, 1 h; c: NH₂OH, EtOH, RT, 5 h.

Es wurde bereits in vielen Versuchen an verschiedenen *para*-aminosubstituierten Benzaldehyden **17a,i,k,l** gezeigt, dass deren gezielte Chlorierung zum Hydroxamsäurechlorid **18a,i,k,l** nicht gelingt, weswegen der naheliegende Syntheseweg von Abbildung 3-53 nicht besprochen werden kann.

3.8.2 Synthesestrategie

Da die Darstellung von *p*-aminosubstituierten aromatischen Benzhydroxamsäurechloriden wie **18a** und **90** nicht auf dem etablierten Syntheseweg möglich war, sollte ein Schutzgruppenkonzept verwendet werden (siehe Kapitel 3.1.3).

Vorherige Versuche zeigten, dass die direkte Synthese über eine *para*-Amino-Verbindung nicht möglich war (siehe Kapitel 3.1.3). Für den Aufbau einer Triazen-Bindung war der primäre Amino-Rest am Aromaten aber essenziell (siehe Abbildung 3-54). Aufgrund dessen sollte auch hier von dem entsprechenden *para*-Nitro-Derivat ausgegangen werden, welches vor der Kopplung zum Triazen zum entsprechenden Amin mit dem etablierten Reagenz Natriumdithionit zu reduzieren war (siehe Abbildung 3-55).

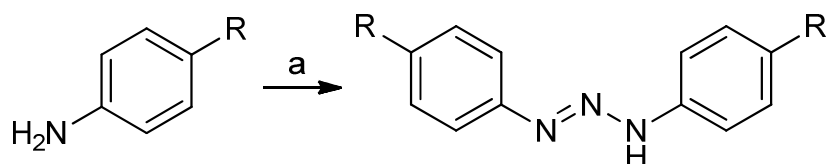


Abbildung 3-54 Klassischer Aufbau eines symmetrischen Triazens. a: NaNO_2 , verd. HCl , NaOAc , 0°C , 30 min.

Die Diazotierungs-Kupplungs-Reaktion zur Darstellung von symmetrischen Triazenen auf klassischem Wege erforderte saure Bedingungen, welche durch die gewählten Schutzgruppen toleriert werden mussten.^{162,163} Gegebenenfalls waren andere Möglichkeiten des Aufbaus einer Triazen-Brücke zu testen.

3.8.3 Bis(*N,N'*-dihydroxy)diminazen

Aus *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) wurde durch Reaktion mit TBDMS-Hydroxylamin **42** in Dichlormethan über mehrere Tage und anschließender Reduktion das geschützte *p*-Amino-Dihydroxybenzamidin **28a** erhalten (siehe Abbildung 3-8, f und g). Da die TBDMS-Schutzgruppen durch Säuren abgespalten werden konnten und eine klassische Synthese der Triazen-Brücke nicht zuließen, wurden alternative Kopplungsverfahren getestet (siehe Tabelle 3-9).^{162,163}

Die Literaturrecherche ergab, dass von Natriumnitrit und verdünnter Salzsäure abweichende Reagenzien ebenfalls den Aufbau einer Triazen-Brücke aus primären aromatischen Aminen möglich machen konnten. Alle Versuche mit *tert*-butyldimethylsilylgeschütztem *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin **28a** führten aber zu einem Zerfall des Ausgangsstoffes ohne dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Detektion des gesuchten Produktes **93** (siehe Tabelle 3-9). Die durch die Schutzgruppen lipophile Verbindung **93** wurde auf der DC-Platte mit großem R_F -Wert im Vergleich zur Ausgangsverbindung **28a** und einer Blaufärbung mit Eisen(III)chloridlösung erwartet.

Tabelle 3-9 Getestete Möglichkeiten zur Bildung von symmetrischen Triazenen in Anlehnung an die angegebene Literatur.

Ausgangs-verbindung	Reagenz	Reaktions-bedingungen	Resultat	Literatur
<i>p</i>NH₂-BDHA-2OTBDMS 28a	$\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_3)_6]$	H_2O , RT, 3-70 h	kein Produkt 93 (siehe Abbildung 3-55), AS 28a zerfallen	Stefane <i>et al.</i> [1997] ¹⁶⁴
	Isoamylnitrit	$\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, RT, 3 h		Smith <i>et al.</i> [1990] ¹⁶⁵
		DCM , RT, 30 min		Anlehnung an Smith <i>et al.</i> [1990] ¹⁶⁵
		EtOH , RT, 1 d		
	<i>t</i> -Butylnitrit	$\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, RT, 1 h		
		EtOH , RT, 1 d		

Ausgangs- verbindung	Reagenz	Reaktions- bedingungen	Resultat	Literatur
<i>p</i>NH₂-BDHA- 2OTBDPS 33a	Na ₃ [Co(NO ₃) ₆]	H ₂ O, RT, 4 h	wenig Produkt 93 detektierbar; AS 28a noch vorhanden	Stefane <i>et al.</i> [1997] ¹⁶⁴
	Isoamylnitrit	DCM, RT, 30 min	kein Produkt 93 , AS 28a zerfallen	Anlehnung an Smith <i>et al.</i> [1990] ¹⁶⁵
		EtOH, RT, 4 h	wenig Produkt 93 detektierbar; AS 28a umgesetzt	
	NaNO ₂ , verd. HCl, NaOAc	Eis-H ₂ O, 0 °C, 15 min, DCM	Produkt 93 detektierbar; AS 28a umgesetzt	de Nino <i>et al.</i> [2008] ¹⁶²

Diese ersten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die TBDMS-Schutzgruppe für die benötigten Reaktionsbedingungen zu instabil war. Aufgrund dessen wurde nach einer stabileren Schutzgruppe gesucht, welche ebenfalls für die Reaktion mit Benzhydroxamsäurechloriden **18** als Hydroxylamin vorliegen konnte und mild und unter Ausschluss von Basen abspaltbar war. Eine erhöhte Säurestabilität war für die klassische Synthese der Triazen-Brücke erwünscht. Die *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe (TBDPS) erfüllte diese Voraussetzungen und konnte auf *p*NO₂-BOxCl **18h** übertragen werden (siehe Abbildung 3-21, Abbildung 3-55).¹³²

Die Resultate der Umsetzungen mit dem so erhaltenen *p*-Amino-*O,O'*-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (*p*NH₂-BDHA2OTBDPS **33a**) fielen deutlich besser aus und bestätigten die Notwendigkeit einer optimaleren Schutzgruppe. Die beschriebene erhöhte Säurestabilität ließ zusätzlich den klassischen Syntheseweg für symmetrische Triazene zu.¹⁶² Letztendlich konnten auf diese Weise die besten Resultate erzielt werden (siehe Tabelle 3-9).

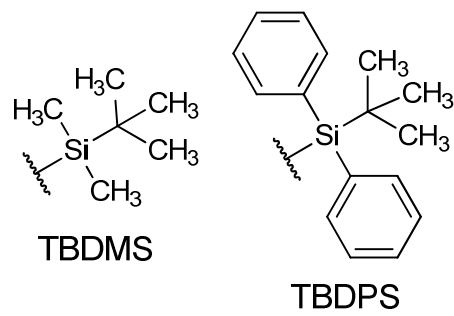


Abbildung 3-55 Die Synthese von Tetrahydroxy-Diminazen 92 sollte über verschiedene Schutzgruppenkonzepte gelingen, von denen das TBDPS-Schutzgruppenprinzip erfolgreich verlief. a, e: TBDMS/TBDPS-HA, DCM, RT-40 °C, 4-10 d; b, f: Natriumdithionit, H₂O/THF, RT, 6 h; c: siehe Tabelle 3-9; g: NaNO₂, verd. HCl, NaOAc, 30 min; (d), h: NH₄F, DCM/MeOH, -20 °C, 1 d.

Dennoch taten sich Probleme in der Synthese auf, welche sich durch die Kopplung zum Triazen potenzierten (siehe Abbildung 3-56). Ein oximartiges Synthesenebenprodukt **95** von *p*NH₂-BDHA2OTBDPS **33a**, welches durch eine unreine Vorstufe **33h** oder durch die Reduktion selbst entstand (siehe Abbildung 3-55, f), führte zu drei möglichen Produkten **94**, **96** und **97**. Da die R_f-Werte beider Vorstufen **33a** und **95** sich in allen getesteten Fließmittelzusammensetzungen als sehr ähnlich herausstellten, war die chromatographische Aufreinigung anspruchsvoll. Eine alleinige Chromatographie nach Kopplung erwies sich als deutlich schwieriger, da es nun drei mögliche Diminazen-Derivate **94**, **96** und **97** als Produkte gab.

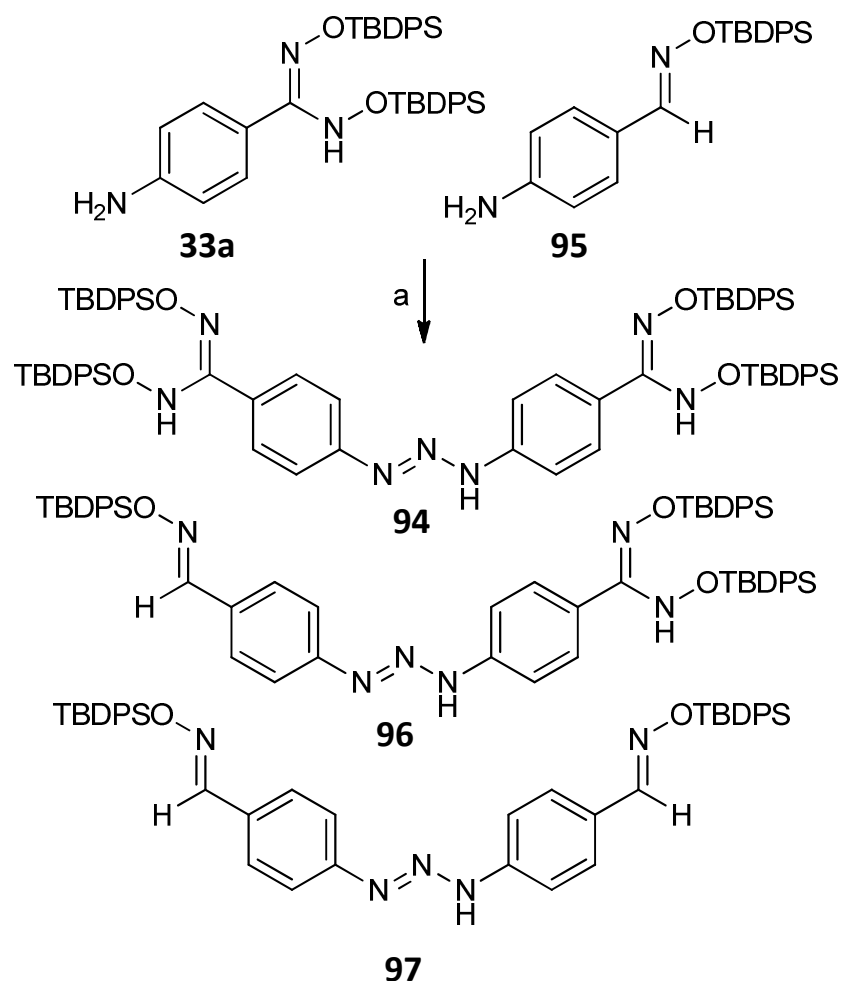


Abbildung 3-56 Das Vorliegen von einer Verunreinigung **95** neben der Ausgangsverbindung **33a** mit chromatographisch sehr ähnlichen Eigenschaften führte zu einer Vergrößerung des Problems nach der Kopplung zum Triazen **94**, **96** und **97** (siehe auch Abbildung 3-55, g). a: NaNO₂, verd. HCl, NaOAc, 30 min.

Wie in Abbildung 3-56 zu erkennen, war es günstiger, eine möglichst quantitative chromatographische Abtrennung des *O*-substituierten Oxims **95** zu erreichen, da das Problem der Aufreinigung durch eine Kopplungsreaktion nur verschleppt wurde. Die *R_f*-Werte der Reaktionsprodukte **94**, **96** und **97** lagen noch näher beieinander als die der Vorstufen **33a** und **95**. Folglich war eine sorgfältige präparative Chromatographie ab einem möglichst frühen Stadium der Reaktionskaskade essenziell.

Die Abspaltung der TBDPS-Schutzgruppen mit Ammoniumfluorid erfolgte analog zur Umsetzung der TBDMS-geschützten Verbindungen vollständig und schnell und wurde zum Schutz des Produktes **92** über Nacht bei -20 °C durchgeführt (siehe Abbildung 3-55, h). Als Lösungsmittel wurde anstelle von Methanol ein Gemisch aus Dichlormethan und wenig MeOH verwendet, da DCM bei deutlich niedrigeren Temperaturen und in kürzerer Zeit entfernbar war. Die Aufreinigung des empfindlichen Tetrahydroxy-Diminazens **92** musste schnell und gezielt über Flashchromatographie verlaufen, da Lagerungen im Lösungsmittel und das Verbleiben auf Kieselgel das Produkt **92** zersetzten. Zahlreiche Wechselwirkungen der Zielverbindung **92** mit der festen Phase erschwerten dies allerdings. Alternativ bot sich eine MPLC über RP-Phase (*Reversed Phase*) mit Methanol und einer durch Trifluoressigsäure (TFA) leicht aciden wässrigen Komponente an, lieferte aber schlechte Ausbeuten.

Im Anschluss war die Gefriertrocknung zur Entfernung des wässrigen Anteils erforderlich. Währenddessen zersetzte sich das empfindliche Tetrahydroxy-Diminazen **92** nahezu vollständig.

3.8.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthese von 1,3-Bis(4,4'-(*N,N'*-dihydroxyamidino)phenyl)triazen (**92**) gelang erfolgreich durch die Anwendung und Weiterentwicklung bisher etablierter Schutzgruppenstrategien. Der Vorteil der *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (TBDMS), durch welche ein Nitro-Rest zum Amino-Rest reduziert werden konnte, ohne die empfindliche funktionelle Gruppe zu zerstören, wurde durch die *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe (TBDPS) noch übertroffen. So zeigten sich die TBDPS-substituierten Verbindungen als säurestabiler und durch eine höhere Lipophilie als ebenfalls sehr gut löslich in den synthetisch präferierten organischen Lösungsmitteln. Dennoch stellte die Synthese sich als sehr mühsam heraus, da die präparative chromatographische Abtrennung der sehr ähnlichen Nebenprodukte, welche beispielsweise durch unsymmetrische Substitution oder teilweise Zersetzung zu unsymmetrischen Produkten anfielen, zeitaufwändig war. Außerdem erwies sich die Zielverbindung **92** als instabil gegenüber dem zur Aufreinigung benötigten Kieselgel. Trotz der Schwierigkeiten konnte Tetrahydroxy-Diminazen **92** in niedrigen Ausbeuten gewonnen werden. Die Nachsynthese kann unter Verwendung der entwickelten Methode erfolgen und die Wirksamkeit der Substanz **92** im Vergleich zum Bissuccinyl-Diminazen untersucht werden.

3.9 Zusammenfassung

Es konnte eine Reihe bisher nicht beschriebener *N,N'*-Dihydroxybenzamidine synthetisiert werden. Die unterschiedlich *para*-substituierten Modellverbindungen wurden ausgehend vom Aldehyd **16** mit Hydroxylaminhydrochlorid zu den entsprechenden Oximen **17** und mit NCS **26** zu Hydroxamsäurechloriden **18** umgesetzt. Anschließend erfolgte die Reaktion mit Hydroxylamin als freier Base und lieferte nach meist flashchromatographischer Aufreinigung *para*-substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**9**). Es ist erstaunlich, dass diese kleinen Moleküle noch nicht literaturbeschrieben sind. Ein Grund könnte sein, dass die Umsetzung durch die fragilen Eigenschaften von Dihydroxybenzamidinen **9** als anspruchsvoll einzustufen ist. Genaue Kenntnisse über nötige Reaktionsbedingungen waren für die Synthesen vonnöten und wurden empirisch ermittelt. Die limitierende Reaktion zur Darstellung von Dihydroxybenzamidinen **9** war meist die Chlorierung des Oxims **17** mit NCS **26**. Bei diesen Umsetzungen entstanden bei Verwendung von *para*-Amino-Substituenten viele Nebenprodukte durch Ringchlorierung ohne Auftreten der gesuchten Hydroxamsäurechloride **18**.

Darüber hinaus konnten verschiedene *O*-substituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidine synthetisiert werden. Dafür wurden im letzten Reaktionsschritt anstelle von Hydroxylamin entsprechend substituierte Hydroxylamine eingesetzt. Literaturbekannte *O*-Substitutionen erfolgen durch Reaktion eines Alkohols mit chlorierten Substituenten. Die dafür nötigen Reaktionsbedingungen wurden durch *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (**9**) als mögliche Dialkohole allerdings nicht toleriert. Die Derivatisierung nur eines Sauerstoffs von BDHAs führte zu den monosubstituierten Verbindungen *O*-Methyl- und *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'**, **10/10'**), welche nebeneinander in zwei tautomeren Formen vorlagen. Mit *O*-Methyl-, *O*-Benzyl-, *O*-Tetrahydropyranyl-, *O*-*tert*-Butyldimethylsilyl- und *O*-*tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin wurden entsprechend disubstituierte nicht literaturbekannte BDHAs **30**, **32**, **27**, **28** und **33** gewonnen.

Über ein Schutzgruppenkonzept mit Tetrahydropyranyl-, *tert*-Butyldimethylsilyl- und *tert*-Butyldiphenylsilyl-Substituenten konnten auch synthetisch schwer zugängliche *p*-aminosubstituierte Dihydroxybenzamidine **9a**, **27a**, **28a**, **33a** dargestellt werden. *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) als einfachstes phenyloges *N,N'*-Dihydroxyguanidin und Tetrahydroxy-Diminazen **92** als potenzielles Prodrug konnten auf diese Weise trotz der nicht erfolgreichen Chlorierung von *p*-aminosubstituierten Benzaldoximen **17** über einen Umweg synthetisiert werden. Die Darstellung der antiparasitären Succinylesterprodrugs Bissuccinyl-Diminazen und PentaPySucc **84** gelang problemlos analog zu bereits bekannten Synthesen.

4 SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.1 Einleitung

Anhand der NMR-Spektroskopie kann eine Reihe von Erkenntnissen über unbekannte Verbindungen erlangt werden. Für die Strukturaufklärung von Verbindungen besitzt die NMR-Spektroskopie wahrscheinlich die größte Bedeutung. Während die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums für die Identitätsüberprüfung oft ausreichend ist, werden für die Strukturaufklärung auch andere NMR-aktive Kerne wie ^{13}C , ^{15}N oder ^{29}Si vermessen und zusätzlich 2D-Kopplungsspektren analysiert.

Die Dihydroxybenzamidine liegen in der energetisch günstigeren Z-Konfiguration vor, wie es bereits für die unsubstituierte Verbindung **9e** gezeigt wurde.⁷⁵ Wie bei den N-substituierten Benzamidoximen **74** kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich die Z-Konfiguration vorliegt, sofern das Amin-Stickstoffatom wenigstens eine kovalente Bindung zu einem Wasserstoffatom besitzt, da in diesem Fall günstige Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Moleküls ausgebildet werden können.^{166,167}

4.2 ^{15}N -NMR-Spektroskopie von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin

Alle mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersuchten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine zeigen einen Signalsatz, weswegen es kein Anzeichen auf *E/Z*-Isomerie der Verbindungen gibt. Die chemischen Verschiebungen der in den synthetisierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen enthaltenen ^{15}N -Kerne sollten gemessen werden, da diese eine Aussage über die Elektronendichte am entsprechenden Atom zulassen können und Informationen über die Elektronendichteverteilung im Molekül liefern (siehe Kapitel 4.8).^{158,168}

In der Abbildung 4-1 ist beispielhaft dargestellt, wie die chemische Verschiebung des einfach gebundenen Stickstoffatoms der Dihydroxybenzamidine bestimmt wurde. Anstelle der Aufnahme eines direkten ^{15}N -NMR-Spektrums wurde eine indirekte Messung bevorzugt, da hierfür weniger Substanzmenge nötig war und eine kürzere Messzeit ausreichte. Im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-2D-Spektrum konnten direkt an ein Proton gebundene Stickstoffkerne detektiert werden. Das Signal des ^{15}N -Kerns wurde durch den ^1H -Kern verstärkt, sodass der ^{15}N -Kern detektiert werden konnte, was in Abbildung 4-1 als das Signal a/3 erkennbar ist.

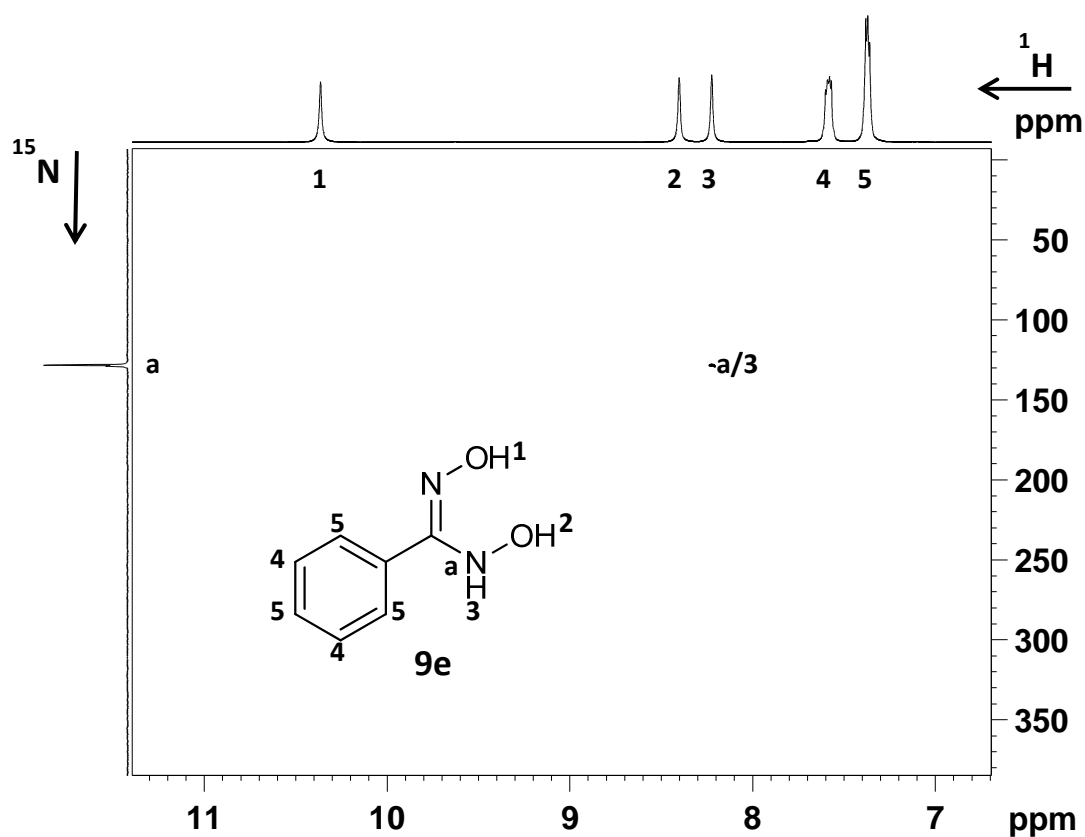


Abbildung 4-1 $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum von N,N' -Dihydroxybenzamidin (**9e**) in $\text{DMSO}-d_6$.

Die indirekte $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)-Spektroskopie verstärkte die Signale weiter voneinander entfernt liegender Kerne. So konnten auch die chemischen Verschiebungen von Stickstoffatomen, die nicht direkt an ein Proton gebunden waren, bestimmt werden. Erfolgreich konnte die Messung aber nur sein, wenn sich Wasserstoffkerne im näheren Umkreis des Stickstoffkerns befanden, das heißt eine von Null verschiedene Kopplungskonstante J besaßen. Im Beispiel des BDHA **9e** wurde das Signal des Stickstoffkerns **b** durch den Wasserstoffkern **1** verstärkt und so sichtbar gemacht (siehe Abbildung 4-2). Eine direkte NH-Bindung war im HMBC durch die große Aufspaltung des Signals **a/3** von 84 Hz erkennbar.

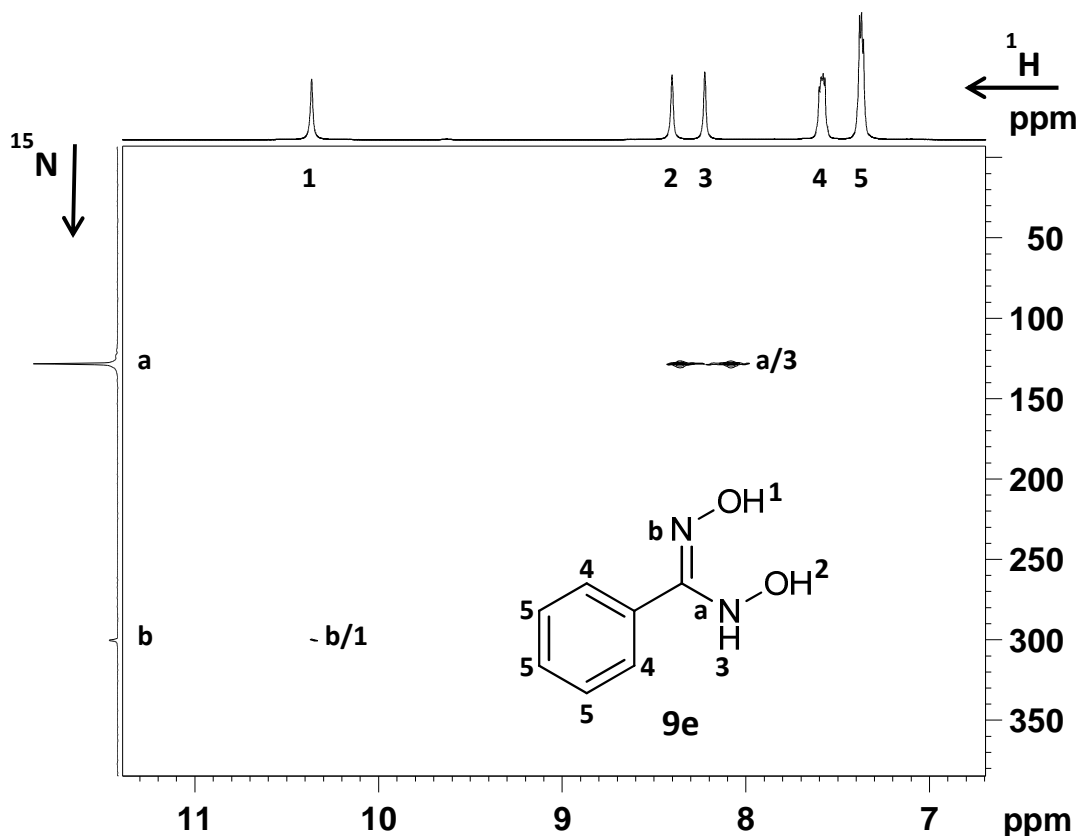


Abbildung 4-2 ^1H , ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum von N,N' -Dihydroxybenzamidin (9e) in $\text{DMSO}-d_6$.

4.3 Spektroskopische Charakterisierung tautomerer O -monosubstituierter N,N' -Dihydroxybenzamidine am Beispiel von p -Methoxy- O -benzyl- N,N' -dihydroxybenzamidin

Die ^1H -NMR-spektroskopische Analyse des Reaktionsproduktes aus p -Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) und O -Benzylhydroxylamin lieferte wider Erwarten offensichtlich ein Gemisch aus zwei Verbindungen annähernd im Verhältnis 1:1 (siehe Abbildung 4-3; siehe auch Kapitel 3.2.3). Der kleine prozentuale Unterschied im Vorliegen der Verbindungen **10/10'** bzw. **31/31'** half bei der Zuordnung der Signale des ^1H -Spektrums zu den jeweiligen Isomeren (siehe Abbildung 4-3). Ebenso zeigten sich alle anderen ^1H -NMR-Spektren O -monosubstituierter N,N' -Dihydroxybenzamidine. Da von einigen N -substituierten Benzamidoximen wie N,N -Dimethylbenzamidoxim (**74c**) bekannt war, dass sie in zwei isomeren Formen E und Z vorkommen, wurde auch in diesem Fall angenommen, dass Diastereomere des Reaktionsproduktes vorlagen (siehe Abbildung 4-4, A oder B). Eine weitere Strukturmöglichkeit nach Aufnahme eines ^1H -Spektrums war das Tautomerengemisch C der Abbildung 4-4.

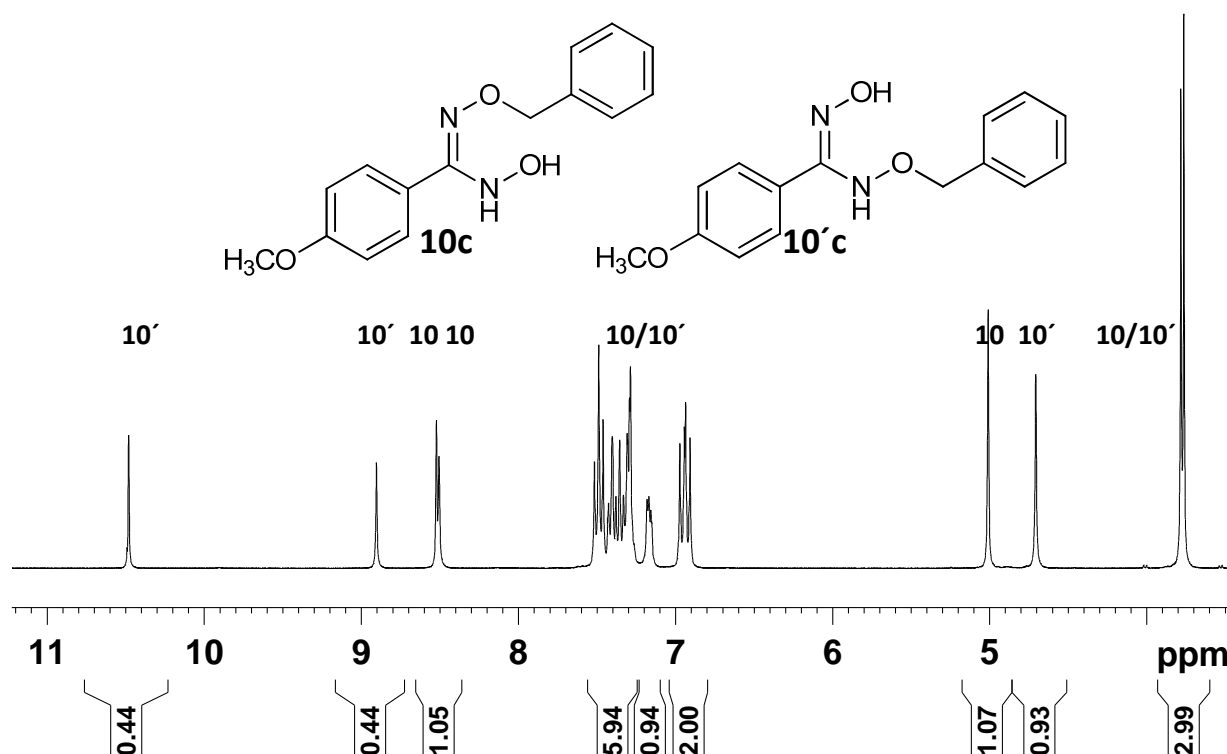


Abbildung 4-3 ^1H -NMR-Spektrum von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (10/10'c) in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Zuordnung 10 bzw. 10' zu den beiden Isomeren: Die strukturelle Identität dieser beiden offensichtlich ähnlichen nebeneinander vorliegenden Verbindungen 10/10'c war zunächst unklar. Mengenmäßig überwog das Vorliegen des Isomers 10c leicht.

In dem Chromatogramm der LC/MS-Kopplung war allerdings nur ein Peak erkennbar. *E/Z*-Isomere (Diastereomere; siehe A und B, Abbildung 4-4) lassen sich für gewöhnlich aber chromatographisch auftrennen. In diesem Fall hingegen lag offensichtlich ein Gemisch aus Isomeren vor, welche sich ineinander umwandeln konnten, sodass sie chromatographisch identisch waren, denn auch die Dünnschichtchromatographie sowie die Flashchromatographie lieferten nur einen Substanz-Spot bzw. -Peak. Die Zeit der Umwandlung ineinander musste aber langsam auf der NMR-Zeit-Skala sein, da zwei scharfe Spektren bei einer Aufnahme erhalten wurden und nicht ein gemeinsames, gemitteltes Spektrum.

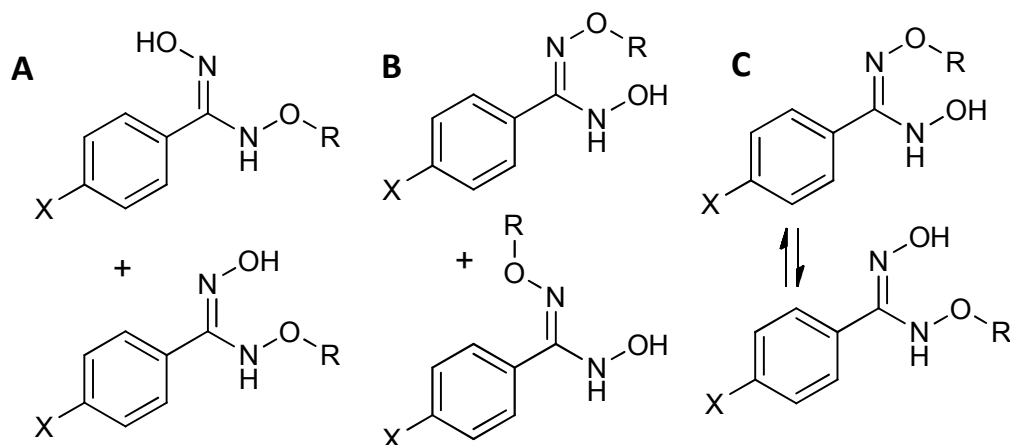


Abbildung 4-4 Die im ^1H -NMR-Spektrum detektierten Gemische 31/31' und 10/10' konnten aus den *E/Z*-Isomeren A oder B oder den Tautomeren C bestehen. Weitere Analysen ergaben, dass es sich dabei um Tautomere (C) handelte.

Sollte es sich trotz der Hinweise um die Isomere A oder B der Abbildung 4-4 handeln, mussten entweder A: zwei *O*-substituierte Amin-Stickstoffatome (-NH-OR) und zwei unsubstituierte *N*-Hydroxyimine (=N-OH) oder B: zwei *O*-substituierte Imin-Stickstoffatome (=N-OR) und zwei unsubstituierte *N*-Hydroxyamine (-NH-OH) im Spektrum erscheinen. Es konnte auch zufällig der Fall sein, dass beide Verbindungen sich chromatographisch sehr ähnelten und unter den getesteten Methoden nicht trennbar waren. Unwahrscheinlich war dies dennoch, da unterschiedliche stationäre Phasen und differierende Fließmittelgemische eingesetzt wurden, aber scheinbar immer nur eine Substanz vorlag.

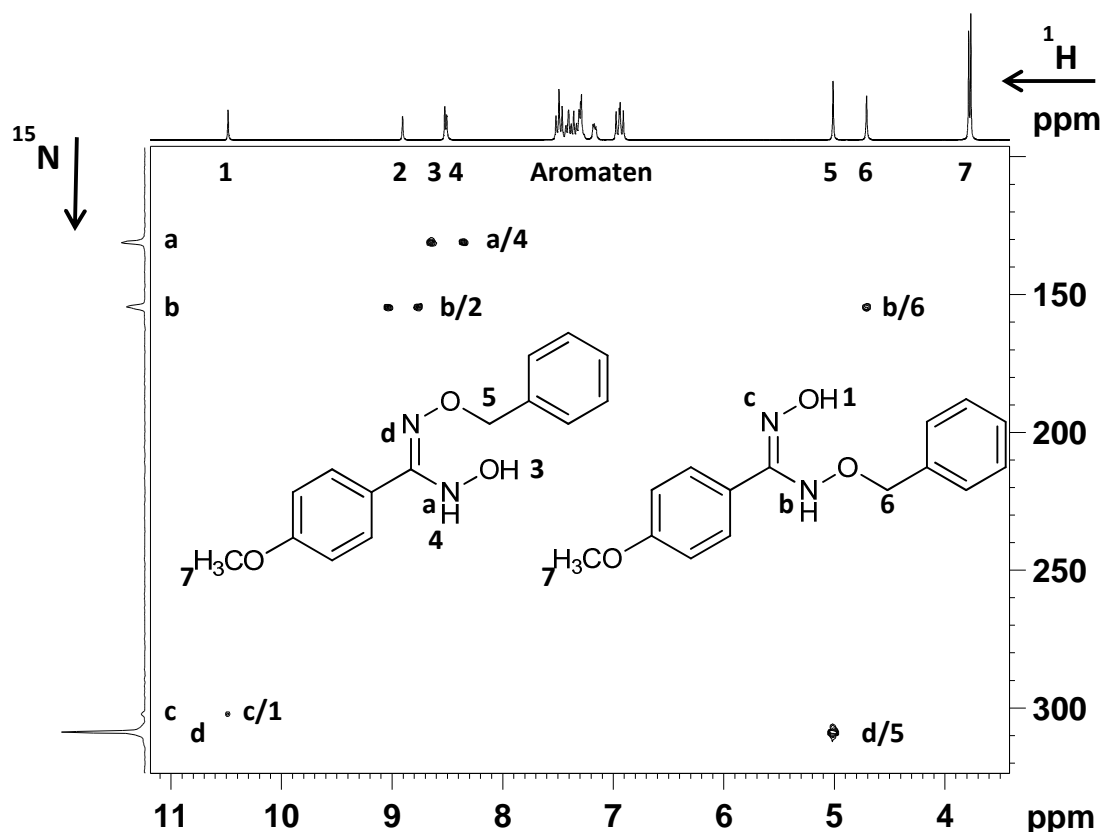


Abbildung 4-5 ^1H , ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (10/10'*c*) in $\text{DMSO-}d_6$ mit der Zuordnung der Signale.

Im ^1H , ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (10/10'*c*) konnten Kopplungen zwischen Protonen und Stickstoffkernen detektiert werden. Deutlich erkennbar waren zwei aufspaltende NH-Signale (a/4 und b/2, Abbildung 4-5), von denen eines eine Kopplung zu einer benachbarten Benzyl- CH_2 -Gruppe zeigte (b/6, Abbildung 4-5). Die zweite detektierte Benzyl- CH_2 -Gruppe (5) koppelte aber nicht mit einem Amin-Stickstoffatom, sondern mit dem Imin-Stickstoffkern d. Folglich hingen die Benzylreste an unterschiedlich gebundenen Stickstoffatomen, wie es die Strukturen in Abbildung 4-5 zeigen. Die Kopplung zwischen dem ^{15}N -Kern c und dem zwei Bindungen (2J) entfernten ^1H -Kern 1 war im Vergleich zur 2J -Kopplung b/6 nur schwach erkennbar, da das Signal 1 weniger scharf als das aliphatische Signal 6 war. Der deutlichere Peak b im Vergleich zu c im indirekten ^{15}N -NMR-Spektrum kam durch die zweifache Signalverstärkung durch die zusätzliche Kopplung b/2 zustande. Die Signalintensität im ^1H , ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum ist stark abhängig von den jeweiligen Kopplungskonstanten J . Im NMR-Experiment wurde auf ein J von 4 Hz optimiert, weswegen die Signale mit einer geringen Abweichung von diesem Wert deutlicher sichtbar waren als Resonanzen stark abweichender Kopplungskonstanten. Typischerweise wurden durch diese Einstellung bevorzugt 2J - und 3J -Kopplungen detektiert.

Diese ausführlichen NMR-spektroskopischen Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass bei allen synthetisierten *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **31/31'**, **10/10'** ein Gemisch aus zwei tautomeren Formen nebeneinander vorlag, welche sich langsam auf der NMR-Zeit-Skala ineinander umwandelten (siehe Abbildung 4-4, C). Es gab bei beiden Verbindungsgruppen eine leicht bevorzugte tautomere Form, die aus den Integralen des ^1H -NMR entnommen werden konnte. Die *O*-methy-

lierten Verbindungen **31/31'** lagen bevorzugt als Tautomer **31'** vor, während bei den *O*-benzilylierten Derivaten **10/10'** die Tautomere **10** überwogen (siehe Abbildung 4-3).

4.4 Spektroskopische Charakterisierung von *O*-disubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen am Beispiel von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin

Im Gegensatz zu denen der *O*-monosubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **31/31'**, **10/10'** waren die NMR-Spektren der disubstituierten Derivate **30**, **32** und **27** etwas übersichtlicher, da keine zwei unsymmetrische tautomere Formen in einem Spektrum nebeneinander vorkamen. Die Tautomere der symmetrisch substituierten Verbindungen **9**, **30**, **32**, **27**, **28**, **33** waren identisch und gaben folglich nur ein NMR-Signalset. Eine Ausnahme stellten die *O,O'*-Ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine (**27**) dar, welche aufgrund der vorhandenen Stereozentren diastereomere NMR-Signalsets gaben.

Das ^1H -NMR-Spektrum von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) zeigte ein entschirmtes NH-Proton **1**, den aromatischen Bereich **2-3** und die beiden Methylgruppen im aliphatischen Bereich **4-5** (siehe Abbildung 4-6). Durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen sollte geklärt werden, zu welcher CH_3 -Gruppe welches Singulett **4/5** gehörte und auf welche Weise die Protonen des Aromaten zuzuordnen waren.

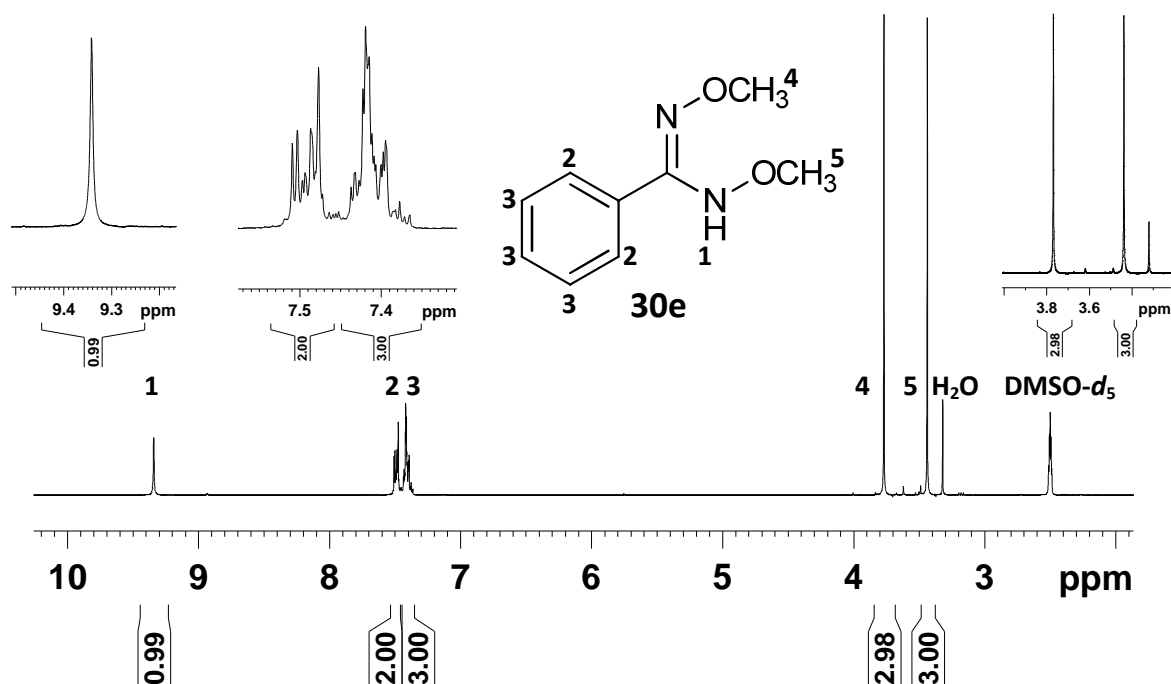


Abbildung 4-6 ^1H -NMR-Spektrum von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Zuordnung der Signale.

Durch die Aufnahme eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrums der Verbindung BDHA2OMe **30e** konnten die Methylgruppen **4** und **5** eindeutig zugeordnet werden. Zu erkennen war durch die deutliche Aufspaltung des Signals, dass der Stickstoffkern **a** direkt an ein Proton **1** gebunden ist. Dieses Stickstoffatom **a** zeigte ebenfalls eine Kopplung zu einer Methylgruppe **5**, eine ^3J -NH-Kopplung, welche im HMBC charakteristischerweise gut zu sehen ist. Die Protonen der anderen Methylgruppe **4** waren 5 Bindungen von dem Amin-Stickstoff **a** entfernt und konnten deswegen kein gemeinsames

Signal geben. Stattdessen erkannte man die Signalverstärkung des Stickstoffkerns b durch die ^1H -Kerne 4 der Methylgruppe sehr gut, da es sich hier ebenfalls um eine Kopplung über 3 Bindungen handelte (siehe Abbildung 4-7). Die chemischen Verschiebungen der Protonen 4 und 5 der Methylgruppen konnten durch die Auswertung des $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrums folglich eindeutig zugeordnet werden.

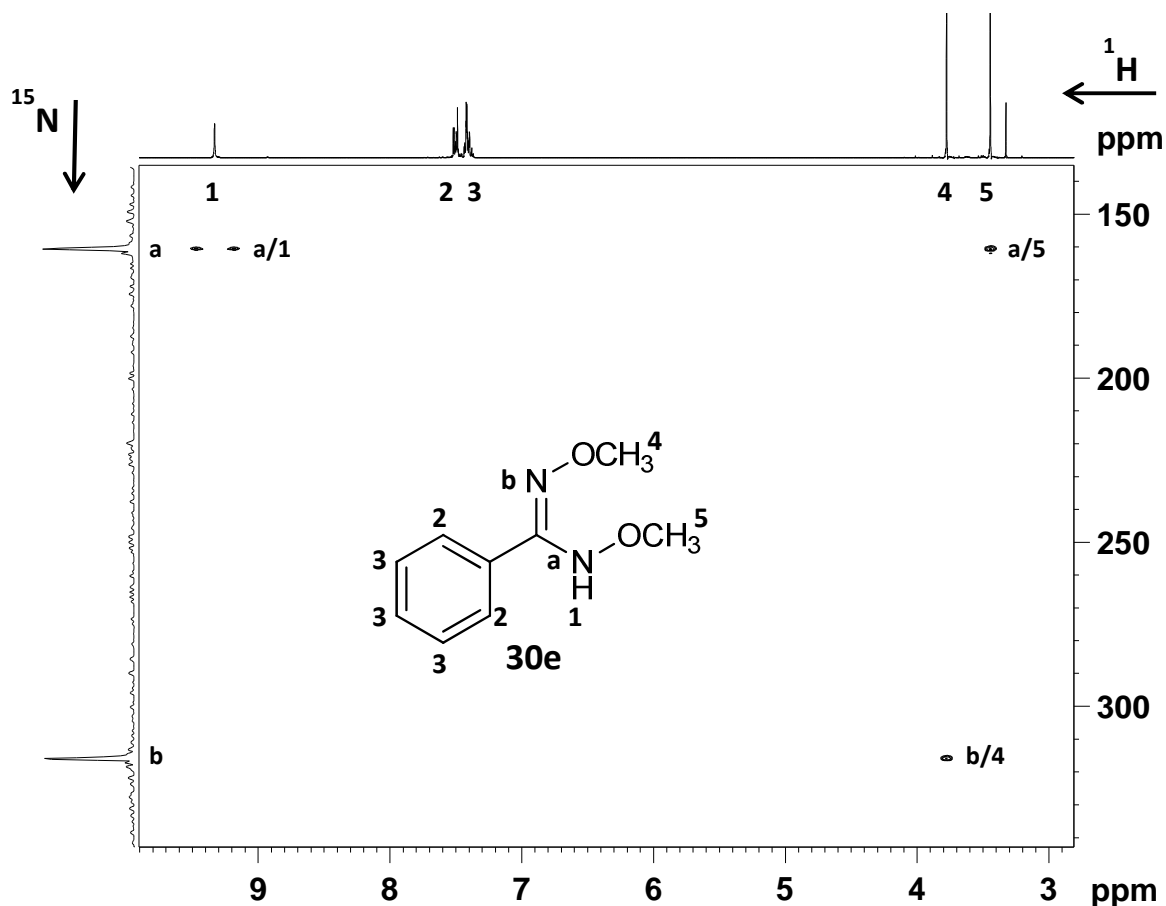


Abbildung 4-7 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30e) in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Zuordnung der Signale.

Für die eindeutige Zuordnung der aromatischen Protonen gab es nur zwei Möglichkeiten, da der Aromat Symmetrie aufwies (siehe Abbildung 4-8). Auf welche Weise A oder B die Signale den einzelnen Protonen zuzuordnen waren, hätte durch die Aufnahme eines NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*)-NMR-Spektrums herausgefunden werden können. Dieses 2D-Spektrum zeigt Kopplungen über den Raum an. Zu erwarten war ein Signal zwischen dem NH-Proton 1 und dem sich räumlich in der Nähe befindlichen Proton des Aromaten (siehe gestrichelte Linie der Abbildung 4-8). Es sollte nur ein Signal von Proton 1 entweder zu dem aromatischen Bereich 2 oder zu dem Multiplett 3 zu sehen sein.

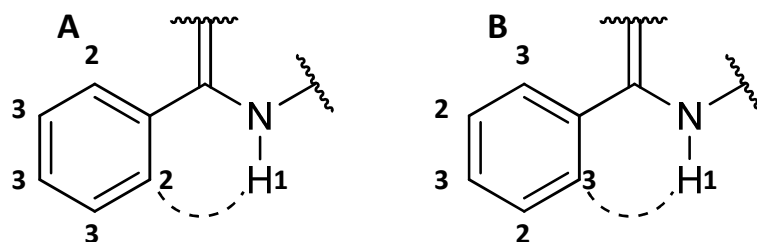


Abbildung 4-8 Visualisierung der zwei Möglichkeiten der Zuordnung der Protonen zu den aromatischen Signalen 2 und 3 des ^1H -NMR-Spektrums von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30e) (siehe Abbildung 4-6).

Die Zuordnung des Protons in *para*-Position zur Dihydroxyamidingruppe zu der Resonanz 3 war eindeutig, da die verbleibenden 4 Wasserstoffatome des Aromaten symmetrisch waren und somit nicht ungleich auf die Signale 2 und 3 verteilt werden konnten. Zur Klärung der Verteilung der Signale 2 und 3 der aromatischen Protonen war die Aufnahme eines $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (*Correlation Spectroscopy*)-NMR-Spektrums, in dem benachbarte Wasserstoffkerne miteinander koppeln, dennoch ungeeignet, da eine Kopplung zwischen Signal 2 und 3 in beiden Fällen A und B der Abbildung 4-8 zu erwarten war.

Für die Bestimmung der chemischen Verschiebung der einzelnen Kohlenstoffatome war die Aufnahme eines $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrums sinnvoll, da hier 1J -Kopplungen, also direkte Bindungen zwischen einem Proton und einem ^{13}C -Kern erkennbar waren (siehe Abbildung 4-9). Das ^{13}C -Signal A konnte durch die Kopplung mit dem bereits eindeutig bestimmten Proton 4 dem entsprechenden Kohlenstoffatom in der Strukturformel **30e** zugeordnet werden. Ebenso verhielt es sich mit dem ^{13}C -Signal B und der Kopplung mit Proton 5. Die chemische Verschiebung des Kohlenstoffs G zeigte eine starke Entschirmung und keine direkte Kopplung an ein H-Atom an, was nur durch Bindung an die beiden Stickstoffatome erklärbar war. Für das verbleibende quartäre C-Atom F blieb nur die in der Strukturformel der Abbildung 4-9 angegebene Zuordnung übrig.

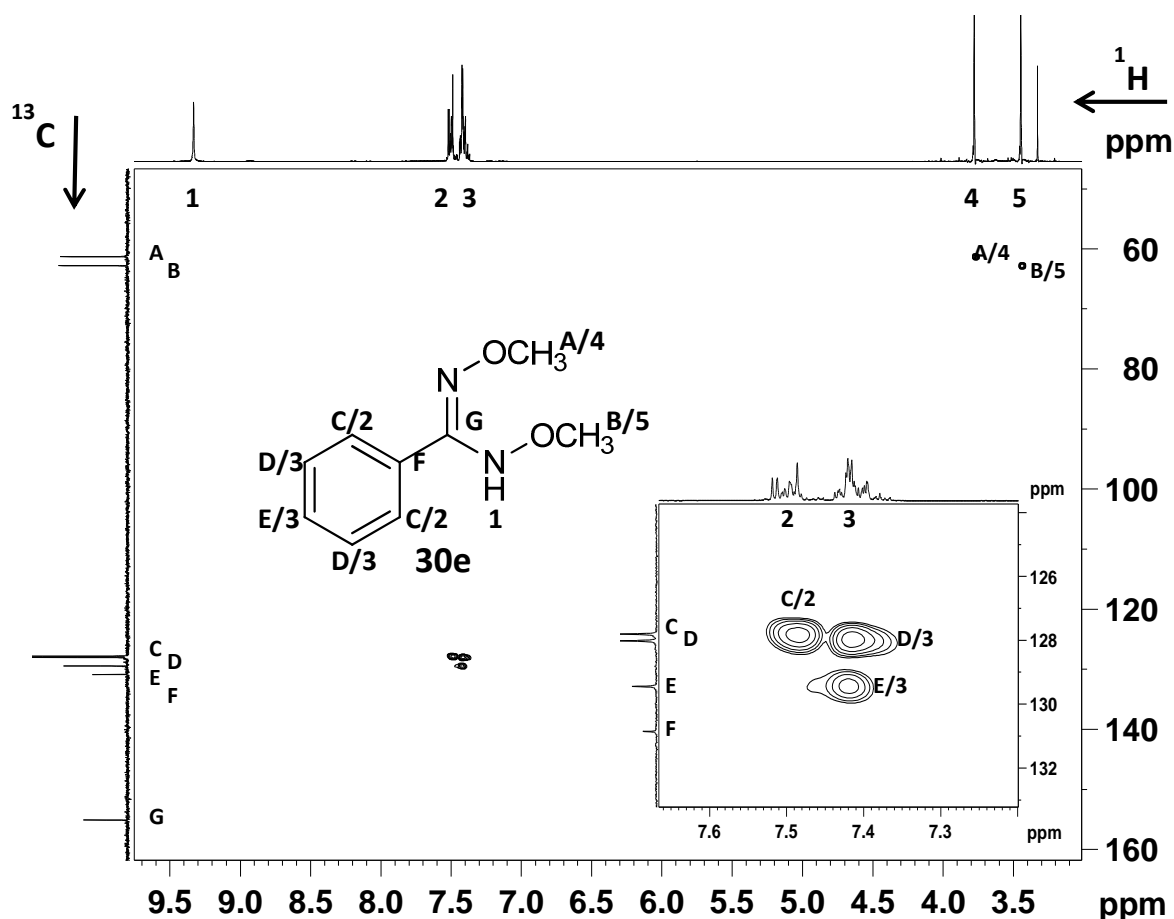


Abbildung 4-9 ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30e) in $\text{DMSO-}d_6$ mit der Zuordnung der Signale.

Wie in Abbildung 4-9 weiterhin zu erkennen ist, konnte das Kohlenstoffsignal E eindeutig der Protonenresonanz 3 zugeordnet werden. Das ^{13}C -Atom E befand sich also in *para*-Position zur funktionellen Gruppe. Da dies zweifelsfrei war, konnte auch ein ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum bei der eindeutigen Zuordnung von 2 und 3 zum Aromaten helfen, da mit dieser Messtechnik 3J -Kopplungen besonders deutlich erkennbar waren und somit Resonanzen des ^{13}C -Atoms E mit den Protonen 2 oder 3 in *meta*-Position erwartet werden konnten. Nach Aufnahme des ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrums konnte das Auftreten der beschriebenen Resonanz bestätigt und die Protonen in *meta*-Position eindeutig als Signal 2 zugeordnet werden (siehe Abbildung 4-10). Weiterhin zeigte der Kohlenstoff F eine erwartete 3J -Kopplung zu Proton 1 und 3 und der entschirmte ^{13}C -Kern G ebenfalls eine 3J -Kopplung zu den ^1H -Kernen 2, was die Zuordnung der aromatischen Protonen bestätigte. Zusätzlich war die 2J -Kopplung G/1 und die 4J -Kopplung G/4 schwach erkennbar (siehe Abbildung 4-10).

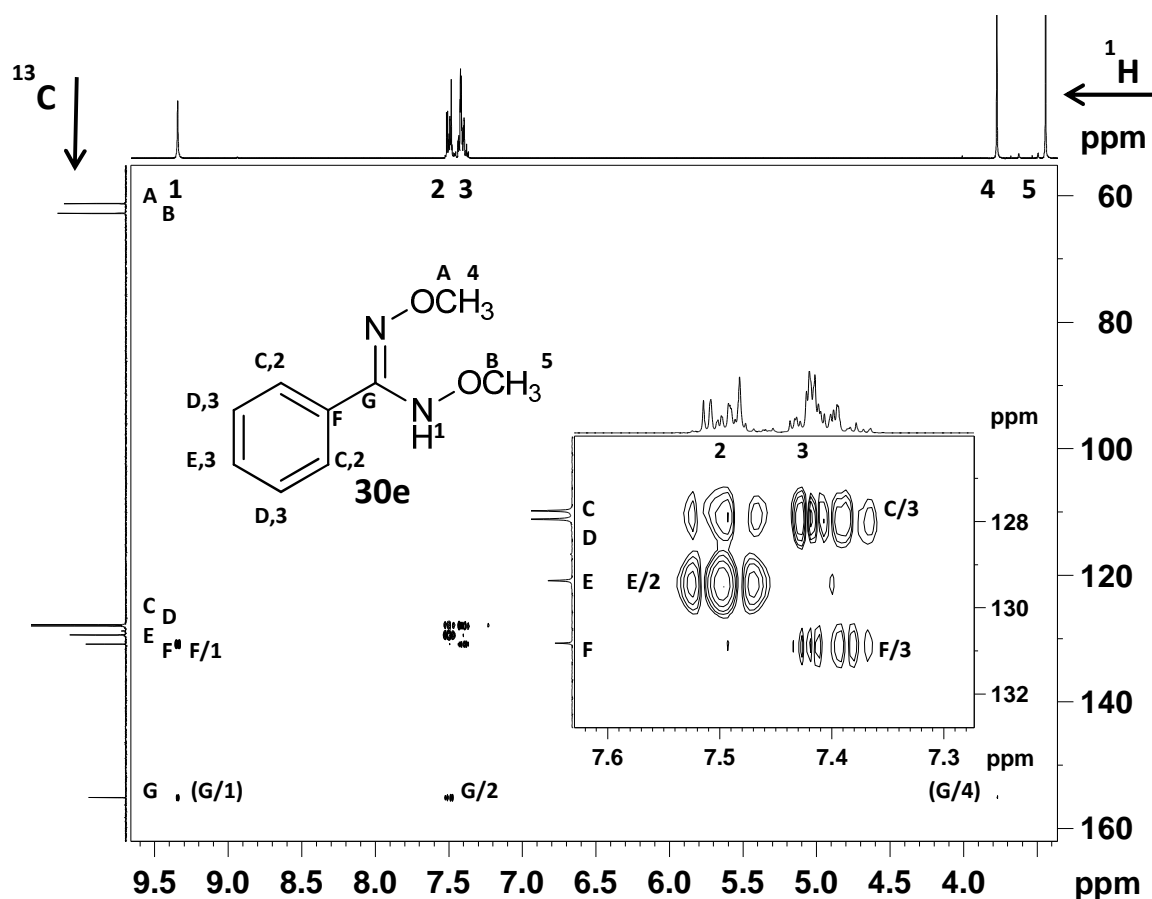


Abbildung 4-10 ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Zuordnung der Signale.

Die Zuordnung der ^{13}C -Kerne des Aromaten war nun durch die eindeutige Bestimmung der chemischen Verschiebungen der Protonen leicht aus dem ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum ablesbar (siehe Abbildung 4-9). In der Vergrößerung unten rechts zeigen die Kopplungen C/2, D/3 und E/3 die Zugehörigkeiten der ^{13}C -Resonanzen zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen des Aromaten an.

Zusammenfassend war die Strukturaufklärung und die Zuordnung der chemischen Verschiebungen aller Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Stickstoffatome des Moleküls BDHA2OMe **30e** durch die Aufnahme verschiedener NMR-Spektren möglich.

4.5 Strukturaufklärung cyclischer *N,N'*-Dihydroxybenzamidine

Bei der Synthese der cyclischen *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 3-39) konnten strukturell unterschiedliche Verbindungen entstanden sein, welche nur durch ein ^1H - oder ^{13}C -NMR-Spektrum, Massenspektrometrie und Elementaranalyse nicht zu unterscheiden gewesen wären. Alle möglichen Strukturformeln besaßen die gleiche molare Masse und die gleiche Summenformel und im ^1H -NMR-Spektrum war eine eindeutige Zuordnung des entschirmten Signals zu einem OH-Proton oder NH-Proton nicht möglich (siehe Abbildung 4-11; Abbildung 4-12).

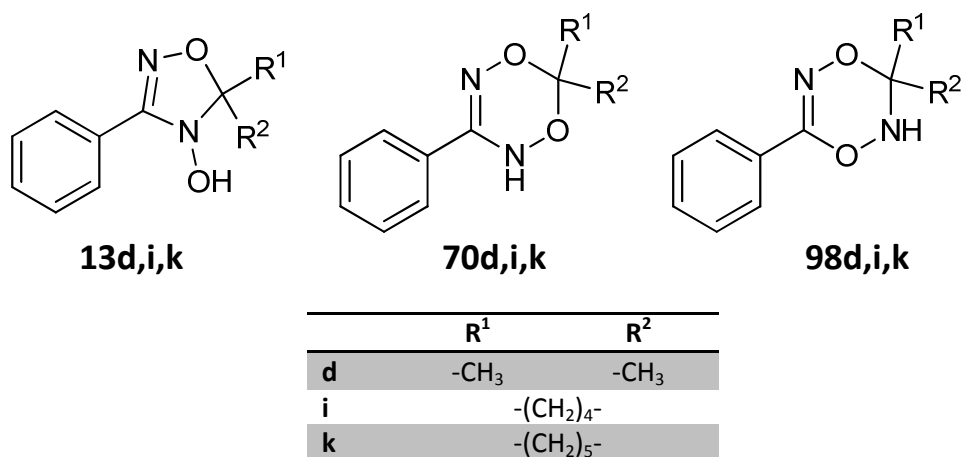


Abbildung 4-11 Bei der Synthese cyclischer *N,N'*-Dihydroxybenzamidine konnten drei unterschiedliche Strukturen **13d,i,k**, **70d,i,k** und **98** entstanden sein. Die Strukturaufklärung sollte mittels NMR-Spektroskopie erfolgen.

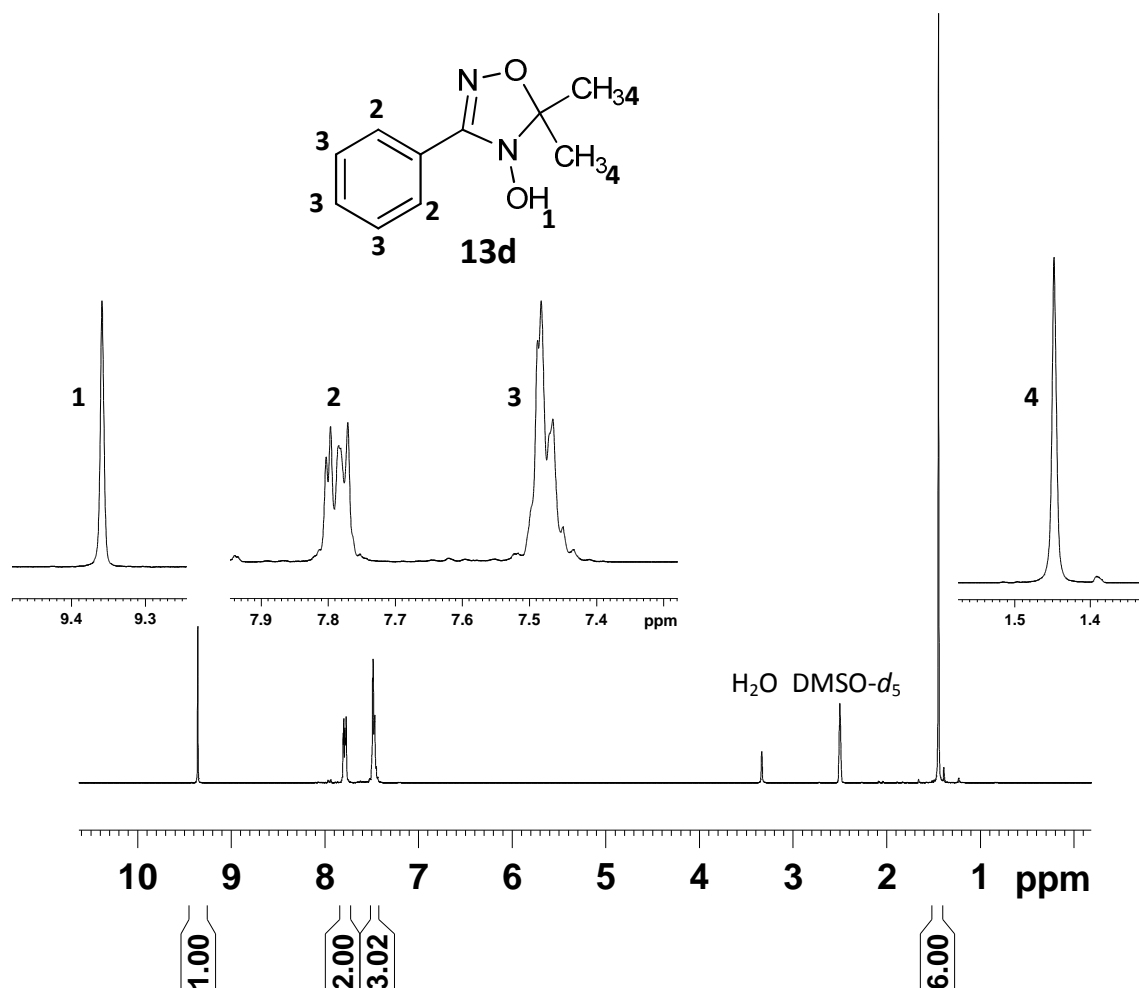


Abbildung 4-12 ¹H-NMR-Spektrum von der nicht geklärten Struktur **13d**, **70d** oder **98d** in DMSO-*d*₆. Das ¹H-NMR-Spektrum allein reichte für eine eindeutige Bestimmung der Struktur nicht aus. Neben der Struktur **13d** waren **70d** und **98d** mit diesem ¹H-Spektrum erklärbar.

Um die möglichen Strukturen **13d,i,k**, **70d,i,k** und **98d,i,k** unterscheiden zu können, konnte mit den Spektren aus der Literatur verglichen werden. Da NMR-Daten zu der bereits literaturbeschriebenen Verbindung **13d** aber fehlten, wurde mit ähnlichen beschriebenen Substanzen verglichen.⁷⁹ Die von Lessel *et al.* [1993] analysierten 1,2,4-Oxadiazole wiesen mit etwa 4.5 ppm eine deutlich

abweichende chemische Verschiebung des NH-Protons auf als die gesuchten unbekannten Strukturen (ca. 9.4 ppm; siehe Abbildung 4-12).¹⁵² Somit war unwahrscheinlich, dass die gesuchten Strukturen eine NH-Bindung enthielten. Andererseits erhielt Lessel die Daten aus Vermessungen von Lösungen der Proben im NMR-Lösungsmittel CDCl_3 , während für die gesuchten Strukturen aufgrund besserer Löslichkeit und Auflösung DMSO- d_6 als Lösungsmittel verwendet wurde. NMR-Spektren in unterschiedlichen Lösungsmitteln können sich insbesondere in der Lage der Signale für Protonen, welche direkt an Heteroatome gebunden sind, deutlich unterscheiden. Aufgrund dessen sollten ^{15}N -NMR-Messungen Aufschluss darüber geben, ob eine NH-Bindung in den gesuchten Strukturen **13d,i,k**, **70d,i,k** oder **98d,i,k** vorlag. War dieses Merkmal nicht gegeben, konnte es sich nur um die Grundstruktur **13** handeln.

Da die direkte Messung von Stickstoffatomen mittels NMR-Spektroskopie eine lange Messdauer erforderte und relativ unempfindlich war, also viel Substanz benötigt wurde, sollten die ^{15}N -Kerne indirekt vermessen werden. Im (indirekten) HSQC-Spektrum können direkte NH-Bindungen detektiert werden, da nur Interaktionen über eine Bindung (1J -Kopplungen) erkennbar sind während im (indirekten) HMBC-Spektrum Interaktionen über 2 und 3 Bindungen in den Vordergrund treten. Interaktionen über 4 Bindungen sind im HMBC-NMR-Spektrum schwächer, aber häufig ebenfalls erkennbar.

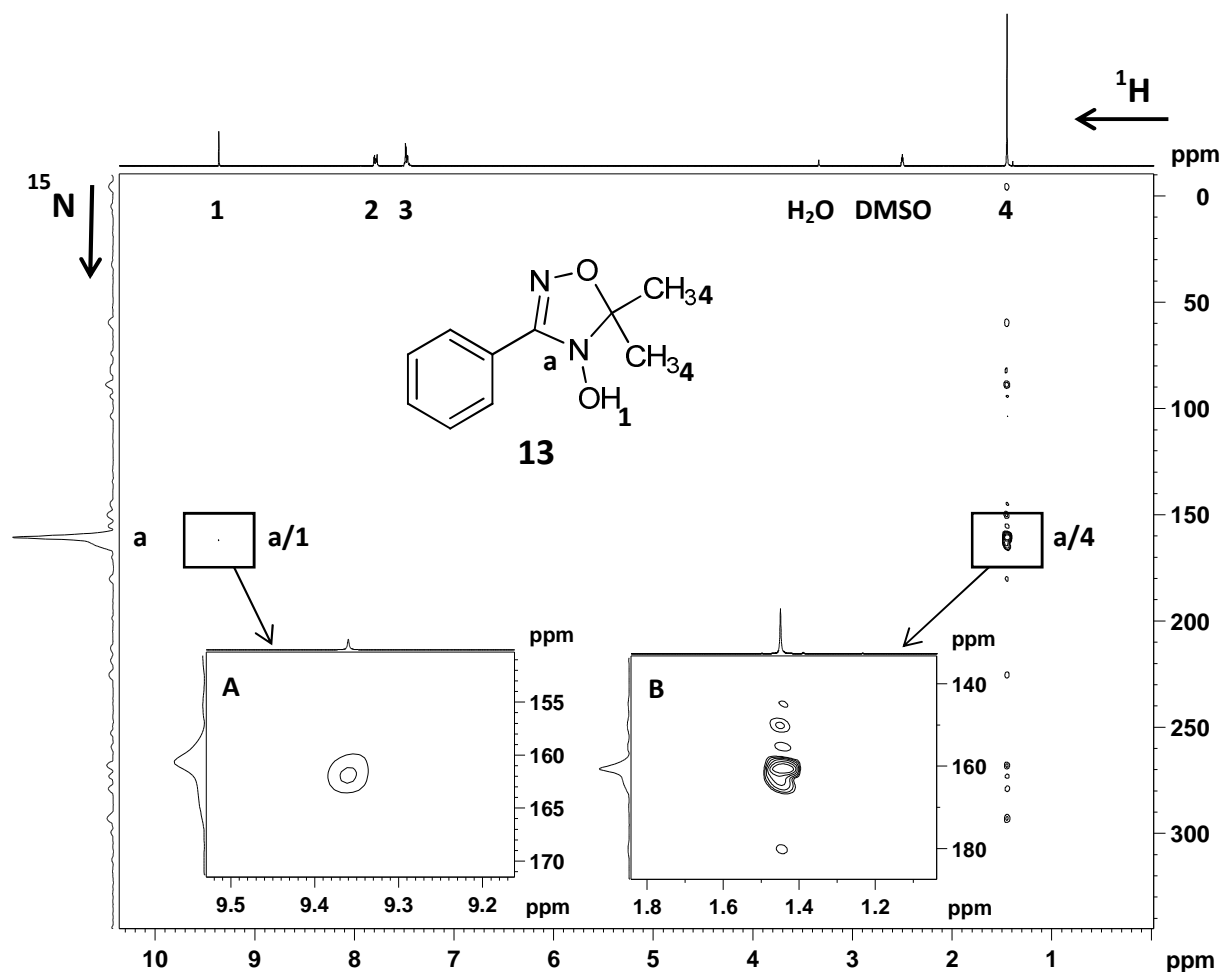


Abbildung 4-13 Das $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von BDHAAc 13d in $\text{DMSO}-d_6$ zur Strukturaufklärung schloss andere mögliche Strukturen aus. A: Vergrößerung der sehr schwachen 2J -Kopplung zwischen dem OH-Proton (1) und dem Hydroxylamin-Stickstoff (a); B: deutliche 3J -Kopplung zwischen den CH_3 -Protonen (4) und dem Hydroxylamin-Stickstoff (a).

Das aufgenommene $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum der Verbindung **13d**, **70d** oder **98d** zeigte keine Kopplung zwischen einem Stickstoff- und einem Wasserstoffkern. Somit war ausgeschlossen, dass die gesuchte Struktur eine NH-Bindung enthielt (Daten nicht gezeigt). Als Schlussfolgerung auf dieses Ergebnis konnten **70d** und **98d** als mögliche Strukturen ausgeschlossen werden. Zur Verifizierung der Annahme wurde zusätzlich ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum aufgenommen, in welchem ein deutliches Signal zwischen den CH_3 -Protonen und dem Hydroxylamin-Stickstoffatom erwartet wurde, da diese in der angenommenen Struktur 3 Bindungen voneinander entfernt lagen und in einem HMBC-Spektrum charakteristischerweise noch deutlich erkennbar sein sollten. Abbildung 4-13 zeigt das aufgenommene HMBC-Spektrum, in welchem wie erhofft die starke 3J -Kopplung (B: a/4) ein dominierendes Signal lieferte. Die Vergrößerung A zeigt die schwache Kopplung zwischen dem alkoholischen Proton (1) und dem Hydroxylamin-Stickstoffkern (a) über zwei Bindungen (2J -Kopplung). Kopplungen zum doppelt gebundenen Stickstoffkern konnten nicht detektiert werden, da alle Protonen der Verbindung zu weit entfernt für eine sichtbare Kopplung lagen. Eine 4J -Kopplung zu den CH_3 -Protonen hätte prinzipiell detektierbar sein können, jedoch geht das Signal hier im Grundrauschen unter. Durch die indirekte Detektion der ^{15}N -chemischen Verschiebungen konnten allerdings nur Kopplungen mit einer Kopplungskonstante im Bereich von $J = 3$ zu ^1H -Kernen erkannt werden. Zu vergleichen wäre die Intensität des erwarteten 4J -Signals mit der Intensität der a/1-

Kopplung aus Abbildung 4-13 (A). Wäre nicht zusätzlich die starke Kopplung $a/4$ zu sehen, würde der indirekte Stickstoff-Peak nicht erkennbar gewesen sein, da er wesentlich schwächer war, als andere Störsignale durch vermeintliche Kopplungen mit den CH_3 -Gruppen (Signale unter 4).

Die Aufnahmen der HSQC- und HMBC-NMR-Spektren für **13i,k** bewiesen ebenfalls das Vorliegen der 5-Ring-Struktur in Form eines 1,2,4-Oxadiazols.

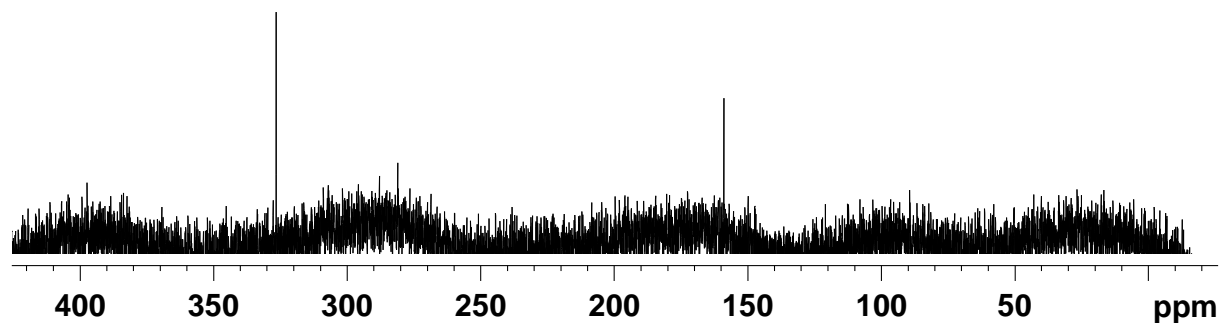


Abbildung 4-14 Darstellung des Spektrums einer ^{15}N -NMR Direktmessung von BDHACypent **13i** in $\text{DMSO}-d_6$, aufgenommen mit dem *inversed gated*-Verfahren.

Im Gegensatz zu den nicht-cyclischen Dihydroxybenzamidinen konnten die chemischen Verschiebungen beider Stickstoffkerne der cyclischen Derivate **13d,i,k** nicht durch eine indirekte Messung bestimmt werden, da das doppelt gebundene Stickstoffatom keine für eine Verstärkung der Signale notwendigen Protonen in näherer Umgebung besaß. Die dichtesten ^1H -Kerne befanden sich 4 Bindungen vom Imin-Stickstoffatom entfernt, was für eine ausreichende Verstärkung des gesuchten Signals offensichtlich nicht ausreichte, da es im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum erwartungsgemäß nicht zu finden war. Aufgrund dessen wurden die chemischen Verschiebungen der beiden Stickstoffatome direkt vermessen, was eine große Probenmenge und eine lange Messdauer erforderte (siehe Abbildung 4-14). Mit dieser Methode konnten alle Resonanzen der Stickstoffkerne der cyclischen *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** detektiert werden.

4.6 Identifikation des Dimers **64**

Schon während einiger Syntheseansätze, in denen BOxCl **18** mit Hydroxylaminen oder Hydroxylaminhydrochloriden zur Reaktion gebracht wurden, fiel auf, dass ein unbekanntes Nebenprodukt **64** entstand. Besonders durch den Zusatz von Basen wie Triethylamin oder Pyridin tauchte die Verbindung **64** auf der DC-Platte auf. Sie zeigte keine Färbung mit Eisen(III)chloridlösung und sollte damit keine freie *N*-Hydroxystruktur haben. Später erwies sich die Verbindung **64** als störend, da sie unter ähnlichen Bedingungen wie BDHA **9e** zur Fällung gebracht werden konnte und das gewünschte Produkt **9e** verunreinigte. Die massenspektrometrische Untersuchung des Nebenproduktes **64** führte zu der Annahme, dass BOxCl **18** unter basischen Bedingungen dimerisierte, da dies mit der ermittelten molaren Masse von 238 g/mol in Einklang zu bringen war. Bei Reaktionen mit *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechloriden **18** wurden ebenfalls die entsprechend substituierten Dimerisierungsprodukte **64** mit dem doppelten Molekulargewicht des intermediären Benzonitriloxids **99** gefunden (siehe Abbildung 4-15).

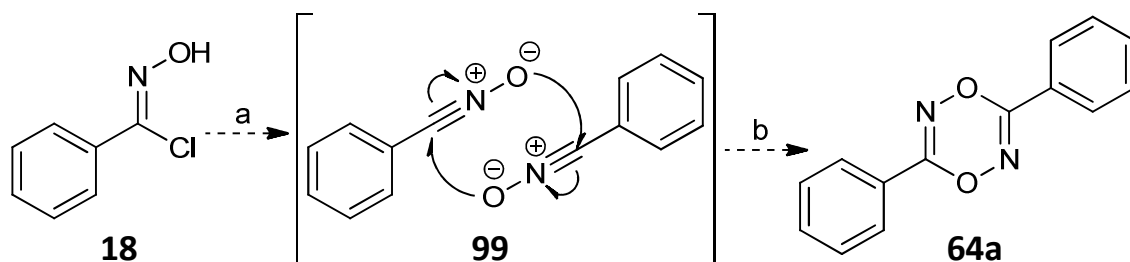


Abbildung 4-15 Postulierte Entstehung und Struktur des Dimers **64**, welches als Synthesenebenprodukt und als Zersetzungsprodukt von BDHA **9e** und BDHAOMe **31/31'e** durch basische Bedingungen (a, b) nachgewiesen wurde.

Nachdem eben dieses Dimerisierungsprodukt **64** auch in den Studien zur Stabilität von BDHA **9e** und BDHAOMe **31e** besonders im Basischen und Neutralen auftrat, sollte die strukturelle Identität des Dimers **64** geklärt werden (siehe Kapitel 3.1.4.1 und 3.2.4.1). Obwohl die Stabilität von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) bereits untersucht wurde, tauchte diese Verbindung in den bisherigen Ergebnissen nicht auf.⁹¹ Bei den hier durchgeführten Stabilitätstests erwies sich das Dimer **64** allerdings als unübersehbares Hauptprodukt innerhalb von zwei Stunden.

Die Aufnahme von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren ließ an der strukturellen Identität **64a** als Dimer zweifeln, denn zu erwarten war eine symmetrische Verbindung mit sehr übersichtlichen Spektren. Besonders das ¹³C-NMR-Spektrum sollte nur 5 Signale zeigen, im DEPT (*Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer*)-NMR-Spektrum sollten nur 3 Resonanzen erkennbar sein, sofern die Struktur **64a** der Identität des gesuchten Dimers **64** entsprach. Gefunden wurden allerdings deutlich mehr Resonanzen, welche mit der Struktur **64a** nicht in Einklang zu bringen waren (siehe Abbildung 4-16).

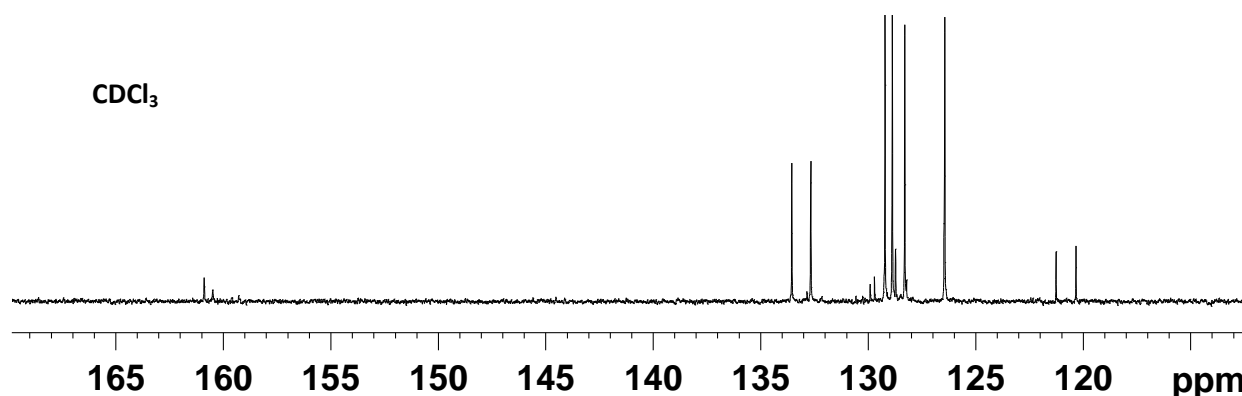


Abbildung 4-16 ¹³C-NMR-Spektrum von dem Dimer **64** unbekannter Struktur in CDCl₃.

Nach Literaturrecherche stellte sich heraus, dass die Verbindung **64a** bekannt und beschrieben war.^{81,169} Die Synthese der Verbindung 3,6-Diphenyl-[1,4,2,5]dioxadiazin (**64a**) nach der angegebenen Vorschrift aus BOxCl **18e** und Pyridin in Chloroform und Aufnahme eines vergleichenden NMR-Spektrums führte allerdings zu dem Ergebnis, dass es sich bei dem unbekannten Nebenprodukt nicht um das in Abbildung 4-15 dargestellte Dimer **64a** handeln konnte. Das erhaltene Spektrum war sehr symmetrisch und glich dem aromatischen Bereich von BOxCl **18e** nahezu völlig. Die Retentionszeit der Verbindung **64a** in der HPLC stimmte zudem nicht mit dem Produkt der Stabilitätsuntersuchungen von BDHA **9e** und BDHAOMe **31/31'e** überein (siehe Abbildung 3-34).

Nachdem die molare Masse des Dimers **64** und die übliche Ausgangsverbindung aber bekannt waren, konnte es nur noch wenige Strukturmöglichkeiten für das gesuchte Dimer **64** geben (siehe Abbildung 4-17).

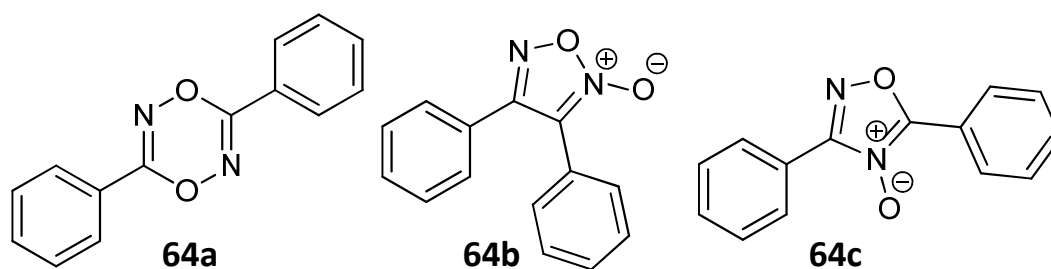


Abbildung 4-17 Mögliche Strukturen des Dimers **64** mit der molaren Masse von 238 g/mol. Isomer **64c** stellte sich als die tatsächliche Struktur des Dimers **64** heraus.

Die Verbindung **64b** war ebenfalls literaturbeschrieben und wurde nach der Vorschrift aus **BOxCl 18e** und Natriumcarbonat in THF/H₂O nachsynthetisiert, weil die NMR-Daten der Literatur in CDCl₃ erhalten wurden, für die eigenen Messungen aber vorerst nur DMSO-*d*₆ als Lösungsmittel diente.⁸¹ Die Aufnahme des NMR-Spektrums in DMSO-*d*₆ schloss dieses Isomer **64b** als Nebenprodukt **64** aus, da dessen charakteristische tieffeldverschobene dublettähnliche Signale der aromatischen *ortho*-Protonen der beiden Phenylreste (AA'-Teilspektrum) im NMR-Spektrum der synthetisierten Verbindung **64b** nicht auftauchten (siehe Abbildung 4-18, Spektrum von **64b** nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das dimere Nebenprodukt unbekannter Struktur **64** im NMR-Lösungsmittel CDCl₃ vermessen und mit den Literaturdaten von Verbindung **64b** verglichen (siehe Abbildung 4-18, oben). Die chemischen Verschiebungen stimmten nicht überein. Auch die Vermessung mittels HPLC bewies, dass das Isomer **64b** nicht die gesuchte Verbindung **64** sein konnte (siehe Abbildung 3-34).

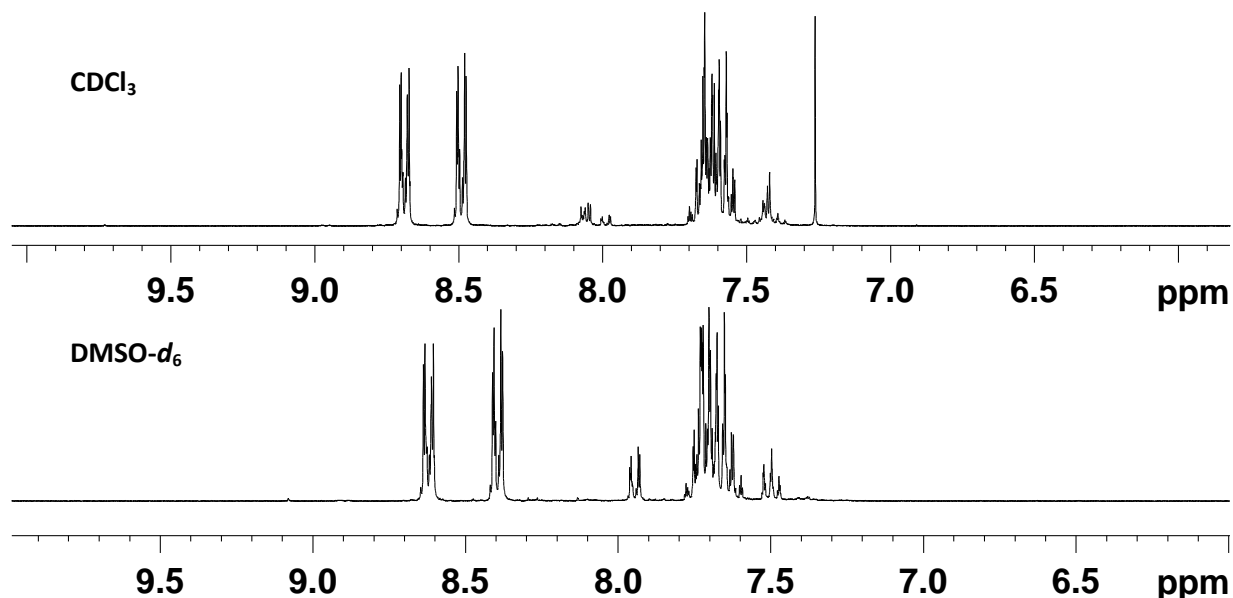


Abbildung 4-18 Die ¹H-NMR-Spektren von dem Dimer ungeklärter Struktur **64** zeigten sowohl in CDCl₃ als auch in DMSO-*d*₆ zwei charakteristische Dubletts bei 8.5 ppm.

Der Vergleich der NMR-Spektren machte aber deutlich, dass die paramagnetisch verschobenen Dubletts sehr charakteristisch zu sein schienen, da die chemischen Verschiebungen von **64a** und **64b**

im Bereich von 7.4-7.9 ppm bzw. 7.4-7.5 ppm lagen und damit keine derart entschirmten Protonen in den Strukturen **64a** und **64b** vorhanden waren. Von Verbindung **64c** wurden bisher keine NMR-Daten publiziert, wenngleich die Verbindung beschrieben und IR-spektroskopisch analysiert worden war.¹⁷⁰ Die ¹H-NMR-Resonanzen einer Verbindung der Struktur **64c** mit Substituenten in *para*-Position hingegen waren veröffentlicht und zeigten eben diese tieffeldverschobenen Signale in Form von Dubletts, welche in den Spektren der Abbildung 4-18 bei etwa 8.5 ppm zu sehen sind.¹⁵⁶ Auf diese Weise konnte die Struktur **64c** für das Dimer **64**, welches sowohl störendes Synthesenebenprodukt als auch Instabilitätsprodukt von BDHA **9e** und BDHAOMe **31e** darstellte und in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben wurde, aufgeklärt werden (siehe Abbildung 4-17, **64c**).

4.7 ²⁹Si-NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die siliziumhaltige TBDMS-Funktion wurde für die Synthese von *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) als geeignete Schutzgruppe für Dihydroxybenzamidine etabliert (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.2.3.4). Die zur Darstellung von *p*-Amino-BDHA **9a** benötigten Derivate *p*-Nitro- und *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h,a**) sowie zwei weitere beispielhaft synthetisierte TBDMS-geschützte Dihydroxybenzamidine **28b,e** sollten vollständig NMR-spektroskopisch analysiert werden. Neben der Aufnahme von ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-NMR-Spektren war für diese Verbindungen auch die Detektion von ²⁹Si-Resonanzen sinnvoll. Das ²⁹Si-Isotop kommt zu etwa 5 % der Siliziumatome vor und ist in NMR-Messungen in etwa so empfindlich wie das ¹³C-Isotop.

Aufgrund der guten Löslichkeit der lipophilen Verbindungen in CDCl₃ wurden die BDHA2OTBDMSs **28**, im Gegensatz zu allen anderen *N,N'*-Dihydroxybenzamidin-Derivaten, in diesem NMR-Lösungsmittel vermessen. Die Spektren wurden auf externes Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$ ppm) in CDCl₃ bezogen.

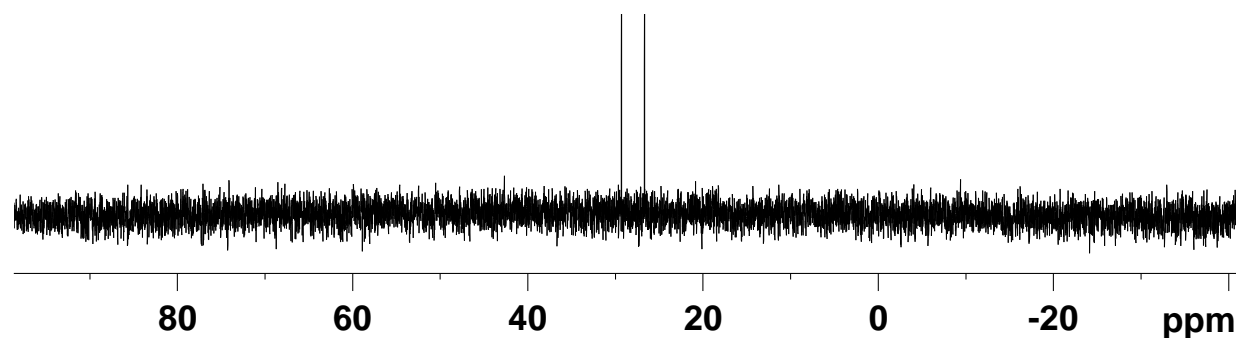


Abbildung 4-19 ²⁹Si-NMR-Spektrum von *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) in CDCl₃.

Für alle Verbindungen wurden wie erwartet zwei Silizium-Signale im NMR-Spektrum erhalten, von denen eines bei allen Verbindungen bei etwa 30 ppm zu finden war, während das andere Signal sich im Bereich von 26-29 ppm befand (siehe Abbildung 4-19). Es stellte sich die Frage, wie die Signale den Siliziumatomen in den Molekülen zuzuordnen waren.

R	Bezeichnung
-NH ₂	28a
-OH	28b
-H	28e
-NO ₂	28h

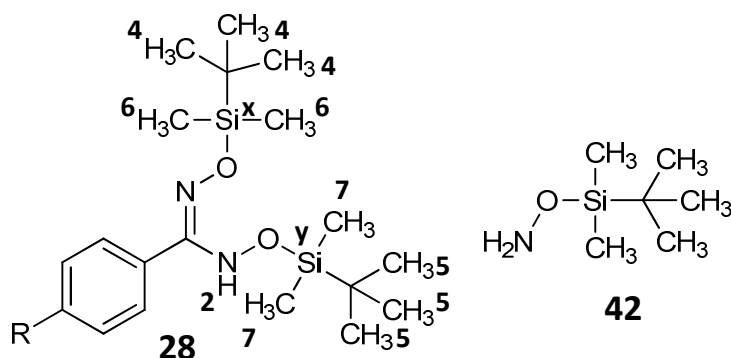


Abbildung 4-20 Allgemeine Struktur von BDHA2OTBDMS **28** mit Kennzeichnung der Silizium-Atome x und y.

Bei allen bisher NMR-spektroskopisch untersuchten Verbindungen konnte gezeigt werden, dass das paramagnetisch verschobene Signal des Sauerstoff-Substituenten mit dem doppelt gebundenen Stickstoffkern koppelte und somit dieser Seitenkette zuzuordnen war. Überträgt man diese Erkenntnis auf das BDHA2OTBDMS-Molekül, sollte Si-x eine größere chemische Verschiebung besitzen als Si-y (siehe Abbildung 4-5, Abbildung 4-20). Die chemische Verschiebung des Silizium-Atoms von *O*-tert-Butyldimethylsilylhydroxylamin (**42**), in dem ebenfalls ein Amin-Stickstoff vorkam, weswegen eine ähnliche chemische Verschiebung wie die von Si-y erwartet werden konnte, lag bei 26 ppm und ähnelte damit dem Si-NMR-Signal im hohen Feld der Abbildung 4-19.

Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, wurde beispielhaft ein $^1\text{H},^{29}\text{Si}$ -HMBC von *p*-Nitro-*O,O'*-di-tert-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**) in CDCl₃ aufgenommen, in welchem die Kopplungen über mehrere Bindungen zwischen den Siliziumatomen und den daran gebundenen Protonen der Methylgruppen bzw. dem NH-Proton erkennbar waren (siehe Abbildung 4-21).

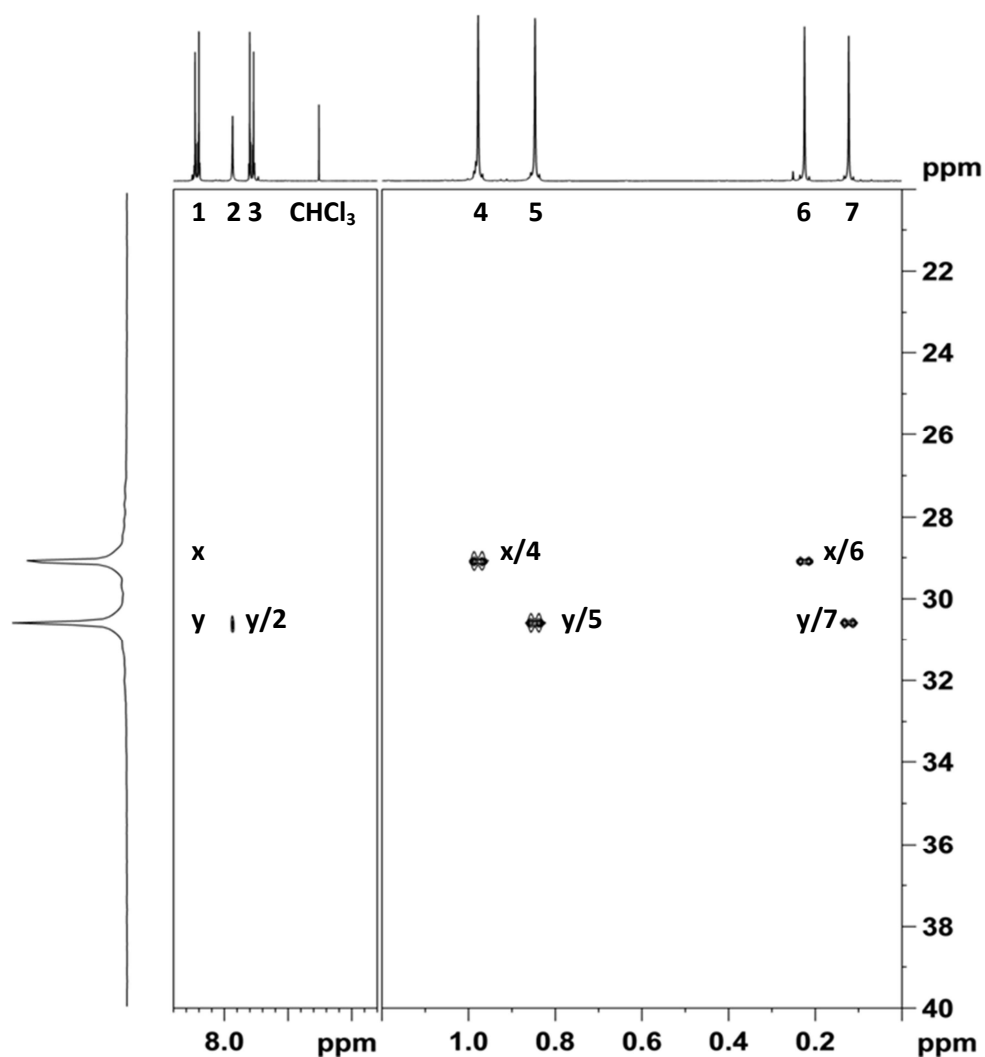


Abbildung 4-21 ^1H , ^{29}Si -HMBC-NMR-Spektrum von *p*-Nitro-*O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**) in CDCl_3 mit der Zuordnung der Signale.

In dem Spektrum der Abbildung 4-21 ist deutlich die Kopplung zwischen dem NH-Proton 2 und dem Siliziumkern-Signal y sichtbar. Folglich befand sich der entschirmtere Siliziumkern y wider Erwarten an der Amin-Seitenkette der BDHA2OTBDMS-Moleküle **28**. Die Kopplungen mit den Methyl-Protonen (y/5, y/7) sind ebenfalls gut zu erkennen. Das abgeschirmtere Silizium x befand sich zusammen mit den entschirmten Methylgruppen 4 und 6 an der Imin-Seitenkette.

Durch die Aufnahme des ^1H , ^{29}Si -HMBC-NMR-Spektrums von *p*-Nitro-*O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**) war nicht nur die eindeutige Zuordnung der Siliziumatome möglich. Auch die Methyl-Protonen konnten nur auf diesem Wege eindeutig zugeordnet werden, denn für eine Kopplung mit den Stickstoffatomen, welche für alle anderen Dihydroxybenzamidine durch ein entsprechendes HMBC-NMR-Spektrum sichtbar gemacht werden konnte, war die Entfernung hier zu groß. Diese Kopplungen konnten im aufgenommenen ^1H , ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum nicht gefunden werden. Die nun sichere Zuordnung der Resonanzen der Protonen durch das ^1H , ^{29}Si -HMBC-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 4-21) ermöglichte zudem die eindeutige Zuordnung der ^{13}C -Atomkerne durch Aufnahme eines ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrums, in welchem direkte CH-Bindungen erkannt werden können (Abbildung nicht gezeigt).

Folglich war die Aufnahme des ^1H , ^{29}Si -HMBC-NMR-Spektrums für die eindeutige Zuordnung vieler NMR-Signale zu den entsprechenden Atomen in den BDHA2OTBDMS-Molekülen **28** essenziell.

4.8 Korrelationen mit Hammett σ -Werten

4.8.1 Einleitung

Für die Prognose der Kinetiken in biologischen Systemen basierend auf NMR-Daten wäre Wasser das geeignetste Lösungsmittel. Allerdings sind die meisten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine in Wasser nicht in ausreichender Konzentration für NMR-Studien löslich oder zu instabil. Außerdem ist für eine vergleichende Vermessung und die Aufstellung von Korrelationen die Verwendung desselben NMR-Lösungsmittels für alle Verbindungen sinnvoll, weswegen DMSO- d_6 verwendet wurde. Für die Interpretation wird eine ähnliche Korrelation in Wasser angenommen.

Substituenteneinflüsse, welche die Elektronendichte eines aromatischen Systems im Vergleich zu einem Wasserstoffatom erhöhen oder verringern, werden durch die Hammett-Konstante σ charakterisiert. Elektronenschiebende Gruppen besitzen eine kleine bzw. negative Hammett-Konstante σ , während σ bei elektronenziehenden Resten einen großen Wert besitzt.³⁴ Der gleiche Substituent verfügt in unterschiedlichen aromatischen Systemen an der gleichen Position auch über den gleichen Effekt, also über die gleiche Hammett-Konstante σ , allerdings besitzt σ für eine andere Stelle im Aromaten auch einen anderen Wert. Der Einfluss durch denselben Substituenten in *ortho*-, *meta*- oder in *para*-Position ist also nicht gleich und zeigt sich durch unterschiedliche Hammett-Konstanten.¹⁷¹

Lineare Korrelationen von chemischen Verschiebungen mit der Hammett-Konstante σ ergeben einen Anstieg, welcher die Empfindlichkeit des betreffenden Atoms zu Änderungen in der Elektronendichteverteilung wiedergibt. Der jeweilige Schnittpunkt mit der y-Achse entspricht der chemischen Verschiebung ohne einen zusätzlichen Substituenteneffekt ($X = \text{H}$; $\sigma = 0$).

4.8.2 ^1H -NMR-Korrelationen

Die Korrelationen nahezu aller chemischen Verschiebungen aus dem ^1H -NMR-Spektrum der funktionellen Gruppen der vermessenen *N,N'*-Dihydroxybenzamidine mit den Hammett-Konstanten σ lieferten signifikante Ergebnisse (siehe Tabelle 4-1). Für das Oxim-Wasserstoffatom (Nummer 1-3), das Hydroxylamin-Hydroxyl-Proton (Nummer 9-11) und das Hydroxylamin NH-Wasserstoffatom (Nummer 17-25) waren die Korrelationen mit $r^2 > 0.99$ in den meisten Fällen hervorragend. Nummer 25 stach mit einem auffallend kleinen Korrelationskoeffizienten r^2 deutlich aus der Reihe heraus, was auf das differierende verwendete NMR-Lösungsmittel CDCl_3 zurückzuführen sein könnte. Die Verbindung BDHA2OTBDMS **28** korrelierte folglich nicht mit den NH-Protonen der Hydroxylamin-Seitenkette.

Tabelle 4-1 Korrelationen der ^1H -NMR chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppen der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine in DMSO- d_6 mit den Hammett-Konstanten σ . *: Lösungsmittel CDCl_3 .

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	r^2 ; (n)
1	Oxim (=NO)H	BDHA 9a-g	$\delta(\sigma) = 0.58 \sigma + 10.32$	0.981 (n = 7)
2	Wasserstoff	BDHAOMe 31'c-g	$\delta(\sigma) = 0.56 \sigma + 10.54$	0.994 (n = 5)
3		BDHAOBn 10'b-h	$\delta(\sigma) = 0.54 \sigma + 10.62$	0.987 (n = 7)

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	$r^2; (n)$
4	substituiertes Oxim (=NOCR _x)H _y	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 0.053 \sigma + 3.74$	0.905 ($n = 5$)
5		BDHA2OMe 30b-h	$\delta(\sigma) = 0.048 \sigma + 3.77$	0.891 ($n = 5$)
6		BDHAOBn 10b-h	$\delta(\sigma) = 0.057 \sigma + 5.02$	0.893 ($n = 7$)
7		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.057 \sigma + 5.06$	0.910 ($n = 7$)
8		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 0.048 \sigma + 5.14$	0.697 ($n = 8$)
9	Hydroxylamin OH	BDHA 9a-g	$\delta(\sigma) = 0.20 \sigma + 8.39$	0.873 ($n = 7$)
10	Wasserstoff	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 0.19 \sigma + 8.51$	0.978 ($n = 5$)
11		BDHAOBn 10b-h	$\delta(\sigma) = 0.19 \sigma + 8.56$	0.946 ($n = 7$)
12		BDHAOMe 31'c-g	$\delta(\sigma) = 0.025 \sigma + 3.46$	0.690 ($n = 5$)
13	substituiertes Hydroxylamin (-NHOCR _x)H _y	BDHA2OMe 30c-g	$\delta(\sigma) = 0.031 \sigma + 3.44$	0.924 ($n = 5$)
14		BDHAOBn 10' b-h	$\delta(\sigma) = 0.045 \sigma + 4.72$	0.862 ($n = 7$)
15		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.043 \sigma + 4.69$	0.891 ($n = 7$)
16		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 0.053 \sigma + 4.79$	0.858 ($n = 8$)
17	Hydroxylamin NH	BDHA 9a-g	$\delta(\sigma) = 0.32 \sigma + 8.19$	0.962 ($n = 7$)
18	Wasserstoff	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 0.35 \sigma + 8.49$	0.996 ($n = 5$)
19		BDHAOMe 31'c-g	$\delta(\sigma) = 0.29 \sigma + 9.01$	0.995 ($n = 5$)
20		BDHA2OMe 30c-g	$\delta(\sigma) = 0.32 \sigma + 9.31$	0.991 ($n = 5$)
21		BDHAOBn 10b-h	$\delta(\sigma) = 0.33 \sigma + 8.59$	0.994 ($n = 7$)
22		BDHAOBn 10' b-h	$\delta(\sigma) = 0.32 \sigma + 8.99$	0.925 ($n = 7$)
23		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.37 \sigma + 9.40$	0.984 ($n = 7$)
24		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 0.41 \sigma + 8.93$	0.970 ($n = 8$)
25*		BDHA2OTBDMS 28a,b,e,h	$\delta(\sigma) = -0.004 \sigma + 7.95$	0.070 ($n = 4$)
26	Oxim (=NO)H Wasserstoff	BAO 14b-h	$\delta(\sigma) = 0.63 \sigma + 9.59$	0.995 ($n = 7$)
27	Amin NH ₂	BAO 14b-h	$\delta(\sigma) = 0.34 \sigma + 5.77$	0.988 ($n = 7$)
28	Wasserstoff	BA 15b,d-h	$\delta(\sigma) = 0.42 \sigma + 9.11$	0.884 ($n = 6$)

Sogar für die Protonen der Alkylsubstituenten neben der Etherbindung von *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen waren die Korrelationen mit den Hammett-Konstanten der *para*-Substituenten signifikant (Nummer 4-8 und 12-16 der Tabelle 4-1).

Von Interesse war auch der Vergleich der chemischen Verschiebungen der vermessenen *N,N'*-Dihydroxybenzamide (Nummer 1-25) mit den zugehörigen Verschiebungen der *para*-substituierten Benzamidoxime **14** und Benzamide **15** als metabolische Abbauprodukte (Nummer 26-28). Aufgrund dessen sind von diesen Verbindungen ebenfalls die Regressionsgeraden der chemischen Verschiebungen der Protonen mit σ in Tabelle 4-1 aufgeführt (persönliche Mitteilung E. Bauch).

Am y-Achsen-Abschnitt der Geradengleichungen konnte erkannt werden, dass das Oxim Hydroxyl-Proton der Dihydroxybenzamide (Nummer 1-3) um etwa 1 ppm paramagnetisch verschoben war im Vergleich zu den Benzamidoximen **14** (Nummer 26). Eine Alkylsubstitution der vicinalen OH-Gruppe (Nummer 2-3) erhöht diese chemische Verschiebung des ¹H-NMR um etwa 0.3 ppm im Vergleich zum unsubstituierten BDHA **9e** (Nummer 1). Die Oxim-Protonen zeigten von allen Wasserstoffatomen der funktionellen Gruppen die größte Empfindlichkeit auf elektronische Veränderungen mit einem Anstieg der Regressionsgeraden von nahezu 0.6 (Nummer 1), welcher dem Anstieg der Benzamidoxim **14**-OH-Gruppe und der BA **15**-Amino-Gruppe ähnelte (Nummer 26 und 28 der Tabelle 4-1; siehe Abbildung 4-22).

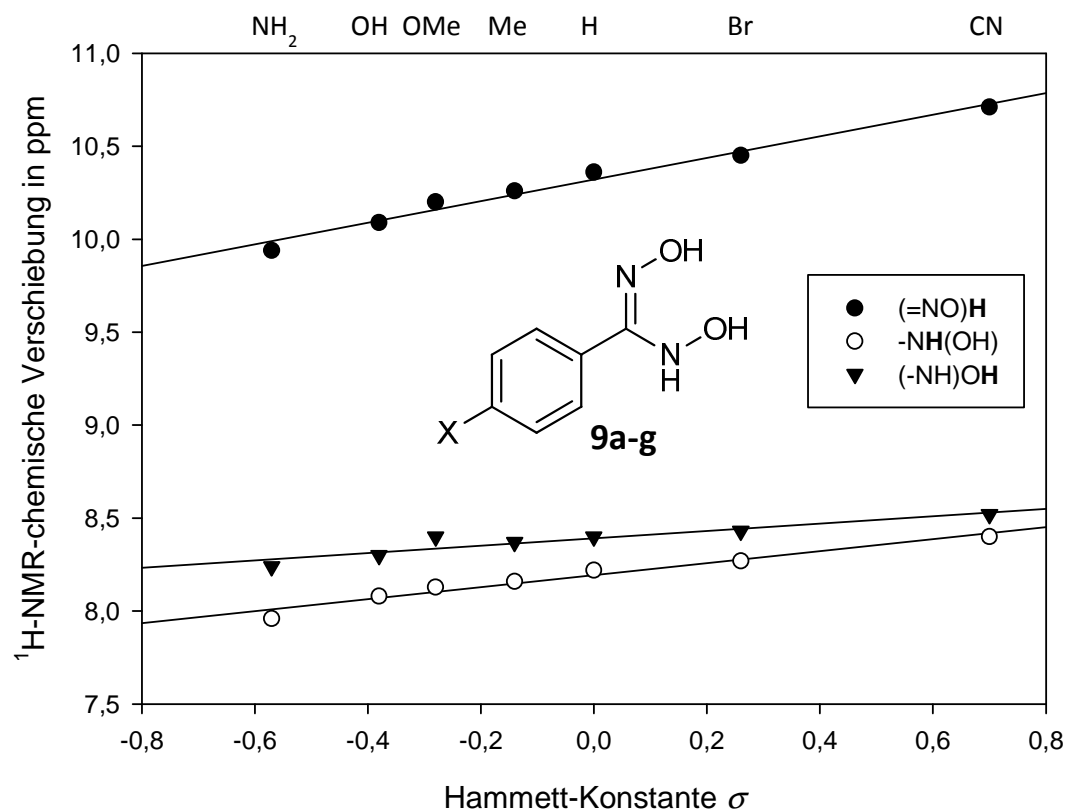


Abbildung 4-22 Graphische Darstellung der Regressionsgeraden der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppe von BDHA 9a-g in $\text{DMSO}-d_6$ mit den Hammett-Konstanten σ .

Die chemischen Verschiebungen der Hydroxylamin-NH-Protonen lagen, wie die entsprechenden NH_2 -Protonen der Benzamidine **15** (Nummer 28), im Bereich von 8-9 ppm (Nummer 17-25). Eine fünf Bindungen entfernte Alkylsubstitution der vicinalen Oxim-OH-Gruppe führte zu einer paramagnetischen Verschiebung der NH-Protonen um etwa 0.3 ppm (Nummer 18 und 21). Bei Substitution der Hydroxylamin-OH-Gruppe waren die Signale sogar etwa 0.8 ppm tieffeldverschoben (Nummer 19 und 22), da sich die beeinflussenden Atome hier nur in einer Entfernung von drei Bindungen befanden. An den O,O' -disubstituierten Derivaten war erkennbar, dass diese Effekte additiv sind (Nummer 20, 23 und 24). Der Regressionsgeraden-Anstieg der Korrelation der Hammett-Konstanten σ mit den NH-Protonen (Nummer 17-24) war mit etwa 0.3 ppm etwa halb so groß wie der Anstieg mit den Oxim-OH-Wasserstoffatomen (Nummer 1-3). Ähnlich empfindlich verlief die Regression mit den NH_2 -Protonen der Benzamidoxime **14** (Nummer 27). Die vier synthetisierten Derivate von BDHA2OTBDMS **28** zeigten keine Korrelation der NH-Protonen mit den Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten, was auf das hier abweichend verwendete NMR-Lösungsmittel CDCl_3 zurückzuführen sein könnte.

Die ^1H -chemische Verschiebung der Hydroxylamin-OH-Protonen von BDHA **9** (Nummer 9) lag bei etwa 8.4 ppm und verschob sich paramagnetisch um etwa 0.15 ppm bei Substitution der vicinalen OH-Gruppe (Nummer 10-11). Der Ringschluss der Derivate BDHA Ace **13d**, BDHA Cynt **13i** und BDHA Cyhex **13k** führte zu einer starken Entschirmung des Hydroxylamin-Protons, welches mit einer chemischen Verschiebung von 9.5 ppm etwa 0.5-1 ppm über derer aller anderen Derivate lag. Die Regressionsgeraden der chemischen Verschiebungen der Hydroxylamin-OH-Protonen mit σ ergaben einen relativ kleinen Anstieg von etwa 0.2 ppm, was auf den vergrößerten Abstand zum *para*-

Substituenten zurückzuführen war. Sogar die Resonanzen der Alkylsubstituenten (Methylgruppen, Methylen-Protonen der Benzylreste und Methin-Protonen der THP-Substituenten) wurden mit einem Anstieg von 0.02-0.06 ppm signifikant durch den *para*-Substituenten des Aromaten beeinflusst (Nummer 4-8 und 12-16), obwohl sie sich bereits neun Bindungen von dem Effektor entfernt befanden.

Der elektronische Effekt durch den Substituenten in *para*-Position spielt also möglicherweise eine bedeutende Rolle für Interaktionen von Enzymen mit der funktionellen Gruppe, da die Elektronendichte der Protonen signifikant beeinflusst wird. Ebenso ist eine gezielte Einflussnahme auf die Elektronendichteverteilung der funktionellen Gruppe durch die Wahl der *para*-Substituenten möglich.

4.8.3 ^{13}C -NMR-Korrelationen

Die ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen des zentralen Kohlenstoffatoms der Dihydroxyamidin-funktionellen Gruppe lagen im Bereich von 153-162 ppm. Es gab keine signifikante Korrelation dieses zentralen Kohlenstoffatoms mit σ , weswegen die Geradengleichungen nicht aufgeführt wurden. Eine *O*-Substitution der Hydroxylamin-Seitenkette führte zu einer diamagnetischen Verschiebung des Kohlenstoffatoms um etwa 2 ppm im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung BDHA **9**, während eine Alkylsubstitution der Oxim-Seitenkette in einer paramagnetischen Verschiebung von etwa 0.3 ppm resultierte. Die zusätzliche Alkylsubstitution am Hydroxylamin-Stickstoffatom bei den cyclischen Verbindungen **13d,i,k** erhöhte die chemische Verschiebung des ^{13}C -Atoms um etwa 2 ppm auf 159 ppm. Die Substituenteneinflüsse der Sauerstoffatome der funktionellen Gruppe schienen additiv zu sein. Folglich befanden sich die chemischen Verschiebungen der *O,O'*-disubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine BDHA2OMe **30** und BDHA2OBn **32** zwischen denen der zugehörigen monosubstituierten Derivate BDHAOMe **31/31'** und BDHAOBn **10/10'**.

Tabelle 4-2 Korrelationen der direkt an das Sauerstoffatom gebundenen ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen der *O*-Substituenten der funktionellen Gruppen der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine in DMSO- d_6 in ppm und der diastereomeren Splits der BDHA2OTHPs **27a-h** in Hz mit den Hammett-Konstanten σ .

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	$r^2; (n)$
1	Oxim-Seitenkette (=NO)CR	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 0.43 \sigma + 61.1$	0.983 ($n = 5$)
2		BDHA2OMe 30 c-g	$\delta(\sigma) = 0.49 \sigma + 61.3$	0.986 ($n = 5$)
3		BDHAOBn 10b-h	$\delta(\sigma) = 0.47 \sigma + 74.9$	0.964 ($n = 7$)
4		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.49 \sigma + 75.1$	0.976 ($n = 7$)
5		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 0.43 \sigma + 100.0$	0.969 ($n = 8$)
6	Hydroxylamin-Seitenkette (-NHO)CR	BDHAOMe 31' c-g	$\delta(\sigma) = 0.16 \sigma + 62.5$	0.804 ($n = 5$)
7		BDHA2OMe 30 c-g	$\delta(\sigma) = 0.21 \sigma + 62.8$	0.902 ($n = 5$)
8		BDHAOBn 10' b-h	$\delta(\sigma) = 0.19 \sigma + 76.7$	0.934 ($n = 7$)
9		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.28 \sigma + 77.0$	0.867 ($n = 7$)
10		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 0.61 \sigma + 101.7$	0.983 ($n = 8$)
11	diastereomerer Split (=NO)CR in Hz	BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = -9.36 \sigma + 12.0$	0.966 ($n = 8$)
12	diastereomerer Split (-NHO)CR in Hz	BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 2.64 \sigma + 23.0$	0.524 ($n = 8$)

Obwohl die Kohlenstoffatome der *O*-Substituenten drei Bindungen weiter entfernt von den Effektoren in *para*-Position des Aromaten lagen als das zentrale Kohlenstoffatom der funktionellen

Gruppe, zeigten sie mit $r^2 > 0.9$ signifikante Korrelationen mit den Hammett-Konstanten σ (siehe Tabelle 4-2). Dabei reagierte der direkte Kohlenstoff-Substituent der Oxim-Seitenkette A mit einem Anstieg von 0.4-0.5 ppm (Nummer 1-5) empfindlicher auf die Veränderung der Elektronendichte durch den *para*-Substituenten als der direkte Kohlenstoff-Substituent der Hydroxylamin-Seitenkette B mit 0.15-0.3 ppm (Nummer 6-9 der Tabelle 4-2 und Abbildung 4-23). Eine Ausnahme stellten die Tetrahydropyranyl-geschützten BDHAs **27a-h** dar, welche eine größere Empfindlichkeit des ^{13}C -Atoms der Hydroxylamin-Seitenkette B mit einem Anstieg von 0.6 ppm zeigten (Nummer 10 der Tabelle 4-2 und Abbildung 4-23).

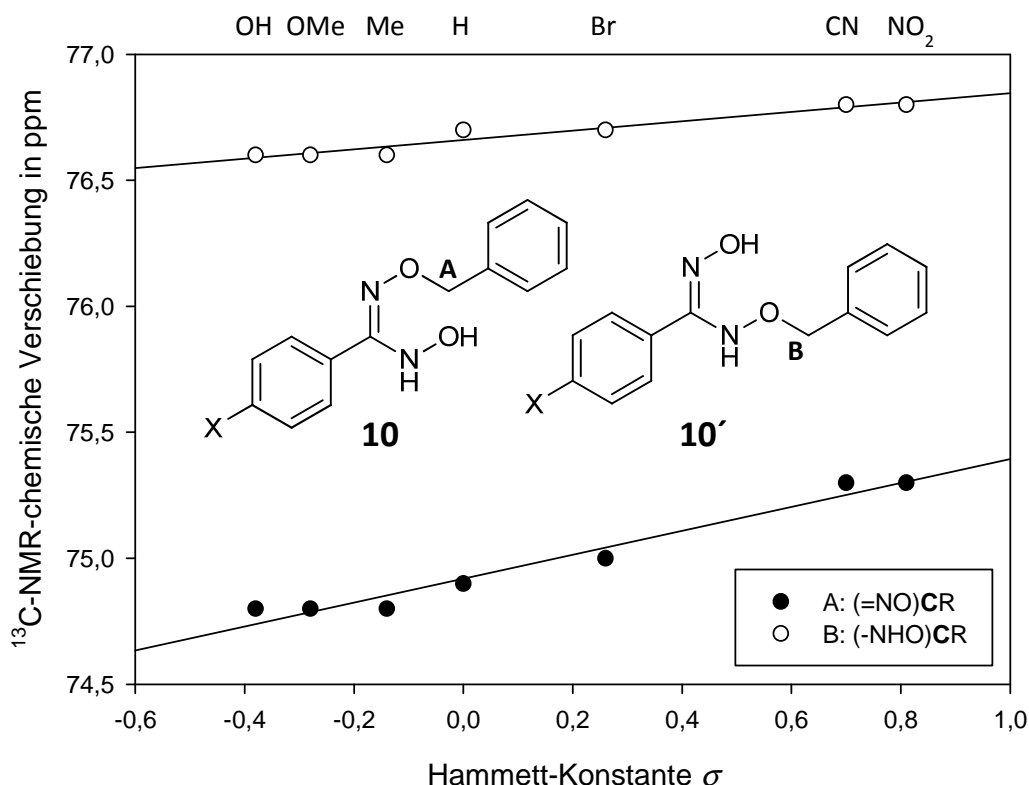


Abbildung 4-23 Graphische Darstellung der Regressionsgeraden der ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen der direkt an das Sauerstoffatom gebundenen Kohlenstoffatome von BDHAObn **10** (Nummer 3) und **10'** (Nummer 8) in $\text{DMSO}-d_6$ mit den Hammett-Konstanten σ .

Die chemischen Verschiebungen der betreffenden Kohlenstoffatome der Oxim-Seitenkette (A) waren in etwa 1.5-2 ppm kleiner als die der Kohlenstoff-Substituenten der Hydroxylamin-Seitenkette (B) (Vergleich Nummer 1-5 und 6-10; siehe Abbildung 4-23). Damit besaßen die *para*-Substituenten einen gegenteiligen Effekt auf diese ^{13}C -chemischen Verschiebungen im Vergleich zu denen der daran gebundenen Wasserstoff-Atome. Eine eventuelle fehlerhafte Zuordnung der Atome konnte eindeutig durch die erkennbare Kopplung der betreffenden Wasserstoffatome mit dem doppelt gebundenen Stickstoffatom aus dem $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.3 und 4.4). Eine zusätzliche *O*-Substitution der jeweils anderen Seitenkette führte zu einer paramagnetischen Verschiebung von etwa 0.2-0.3 ppm (Vergleich Nummer 1 und 2, 3 und 4, 6 und 7, 8 und 9 der Tabelle 4-2).

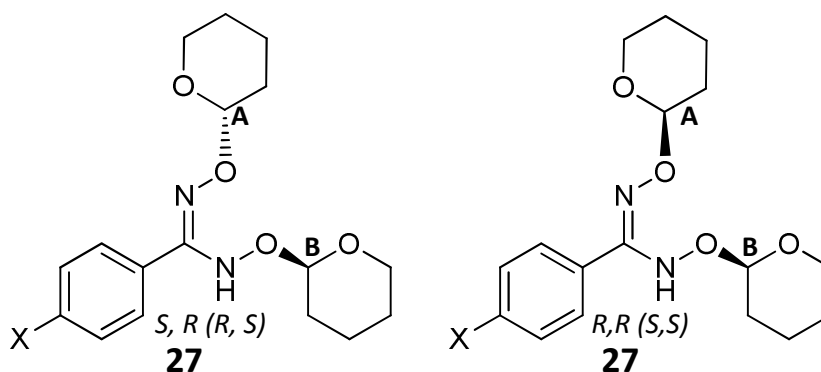


Abbildung 4-24 Diastereomerenpaar von *O,O'*-Ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen **27**. Durch die mögliche Tautomerie sind *S, R* bzw. *R, S* sowie *R, R* und *S, S* identisch.

Alle ^{13}C -chemischen Verschiebungen eines BDHA2OTHP-Moleküls **27** kamen doppelt vor, da es durch die Stereozentren A und B der THP-Reste zwei diastereomere Verbindungen gibt (siehe Abbildung 4-24). Die beiden Signalsets lagen dicht beieinander. Ihr Abstand konnte sinnvollerweise in Hertz ($\Delta\nu$ in Hz) angegeben werden, da die Werte in ppm sehr klein wären. Eine direkte Umrechnung in ppm war durch den direkten Zusammenhang mit der Spektrometerfrequenz ν_0 in MHz möglich (siehe Formel 5).

Formel 5 Direkter Zusammenhang des Abstandes zweier chemischer Verschiebungen $\Delta\delta$ in ppm und $\Delta\nu$ in Hz durch die Spektrometerfrequenz ν_0 in MHz.

$$\Delta\delta(\text{in ppm}) = \frac{\Delta\nu}{\nu_0}$$

Interessanterweise zeigte der diastereomere Split des direkt gebundenen Kohlenstoffatoms des *O*-Substituenten der Oxim-Seitenkette A mit $r^2 > 0.9$ eine eindeutige Korrelation mit den elektronischen Einflüssen der Substituenten in *para*-Position (siehe Nummer 11 der Tabelle 4-2). Deutlich erkennbar bei der Auswertung der NMR-Spektren war die Abnahme des Abstandes dieser beiden Signale der Diastereomere mit zunehmendem Elektronenzug durch den *para*-Substituenten (siehe Abbildung 4-25). Der diastereomere Split der ^{13}C -Atome B hingegen änderte sich wenig, vergrößerte sich aber tendenziell etwas (siehe Nummer 12 der Tabelle 4-2 und Abbildung 4-25).

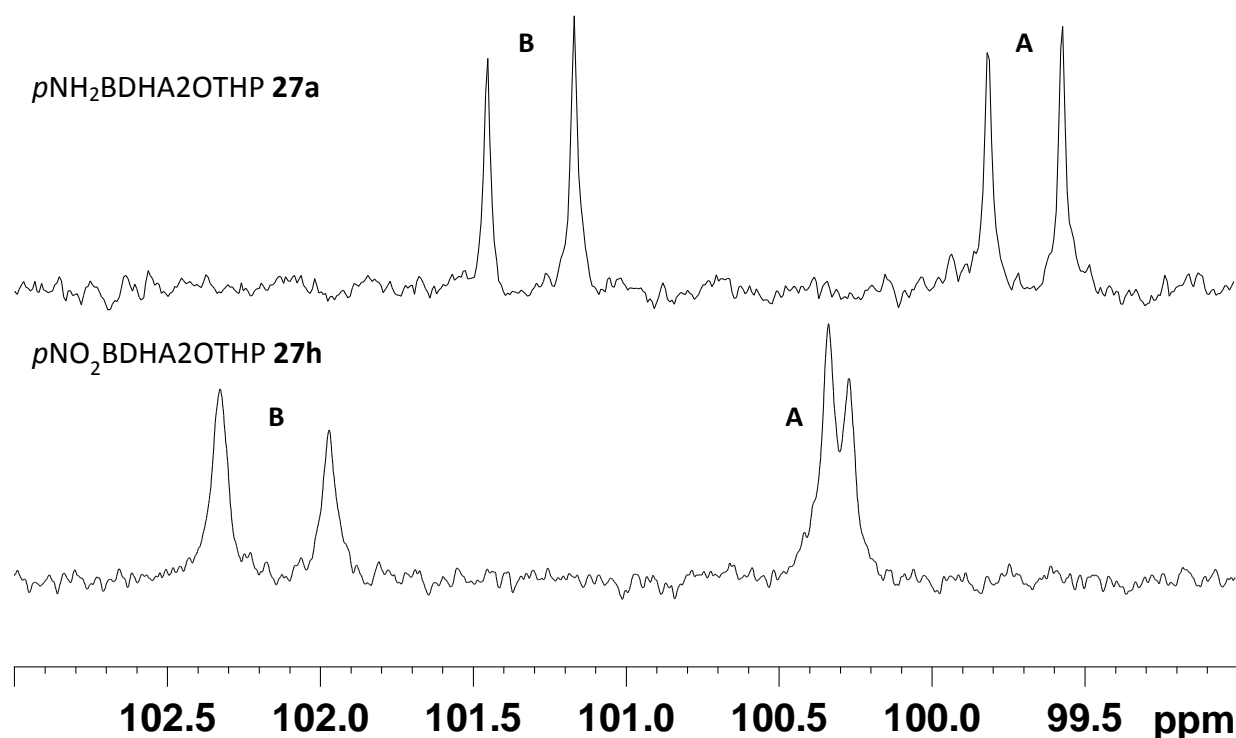


Abbildung 4-25 ^{13}C -NMR-Spektrum der Kohlenstoffatome der Stereozentren mit deren diastereomerem Split von *para*-Amino-BDHA2OTHP **27a** ($\sigma = -0.57$) und *para*-Nitro-BDHA2OTHP **27h** ($\sigma = 0.81$). Zur Zuordnung von A und B siehe auch Abbildung 4-24.

4.8.4 ^{15}N -NMR-Korrelationen

In früheren Untersuchungen konnten bereits signifikante Korrelationen zwischen ^{15}N -NMR chemischen Verschiebungen und *para*-Substituenten von Benzamidoximen **14** und Benzamidinhydrochloriden **15** mit den Hammett-Konstanten σ beobachtet werden. Dementsprechend erlauben ^{15}N -NMR-Untersuchungen Vorhersagen über die Kinetiken von biologischen Reaktionen dieser Substanzklassen.¹⁶⁸ Dihydroxybenzamidine konnten diesbezüglich bisher nicht untersucht werden, da Derivate mit unterschiedlichen *para*-Substituenten nicht vorlagen. Die nun erhaltenen Ergebnisse der vorliegenden ^{15}N -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden in Form von Regressionsgeraden mit den Hammett-Konstanten σ in Tabelle 4-3 aufgeführt.

Tabelle 4-3 Korrelationen der ^{15}N -NMR chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppen der *N,N'*-Dihydroxybenzamidine in DMSO-*d*₆ mit den Hammett-Konstanten σ . *: Lösungsmittel CDCl₃.

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	r^2 ; (n)
1	Oxim =N(OH)	BDHA 9a-g	$\delta(\sigma) = 8.1 \sigma + 300.0$	0.985 (n = 7)
2	Stickstoff	BDHAObn 10'c-e	$\delta(\sigma) = 7.5 \sigma + 304.5$	0.942 (n = 3)
3	Oxim =N(OR)	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 4.7 \sigma + 312.7$	0.913 (n = 5)
4	Stickstoff	BDHA2OMe 30c-g	$\delta(\sigma) = 4.7 \sigma + 315.7$	0.968 (n = 5)
5		BDHAObn 10b-h	$\delta(\sigma) = 4.8 \sigma + 310.1$	0.968 (n = 7)
6		BDHA2Obn 32b-h	$\delta(\sigma) = 4.3 \sigma + 313.3$	0.980 (n = 7)
7		BDHA2OTHP 27a-f,h	$\delta(\sigma) = 4.3 \sigma + 312.2$	0.969 (n = 7)
8*		BDHA2OTBDMS 28a,b,e,h	$\delta(\sigma) = 12.5 \sigma + 306.9$	0.527 (n = 4)
9	Hydroxylamin	BDHA 9a-g	$\delta(\sigma) = 0.49 \sigma + 128.2$	0.477 (n = 7)
10	NH(OH/R) Stickstoff	BDHAOMe 31c-g	$\delta(\sigma) = 0.23 \sigma + 130.9$	0.734 (n = 5)

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	$r^2; (n)$
11		BDHAOMe 31'c-g	$\delta(\sigma) = -0.30 \sigma + 158.4$	0.110 ($n = 5$)
12		BDHA2OMe 30c-g	$\delta(\sigma) = -0.05 \sigma + 160.3$	0.058 ($n = 5$)
13		BDHAOBn 10b-h	$\delta(\sigma) = 0.56 \sigma + 131.3$	0.832 ($n = 7$)
14		BDHAOBn 10'b-h	$\delta(\sigma) = 0.33 \sigma + 154.8$	0.148 ($n = 7$)
15		BDHA2OBn 32b-h	$\delta(\sigma) = 0.15 \sigma + 157.1$	0.407 ($n = 7$)
16		BDHA2OTHP 27a-h	$\delta(\sigma) = 1.95 \sigma + 150.0$	0.815 ($n = 8$)
17		BDHA2OTBDMS 28a,b,e,h	$\delta(\sigma) = 0.33 \sigma + 141.2$	0.009 ($n = 4$)

Die ^{15}N -NMR-chemischen Verschiebungen der oximartigen Stickstoffatome der O,O' -unsubstituierten BDHAs **9** lagen bei 300 ppm (Nummer 1) und wurden durch Substitution des Hydroxylamin-Sauerstoffatoms paramagnetisch um etwa 4.5 ppm verschoben (Nummer 2). Eine O -Substitution der Oxim-Seitenkette entschränkte den Stickstoffkern, erkennbar an der Erhöhung der chemischen Verschiebung, um etwa 12 ppm (Nummer 3 und 5). Eine zusätzliche Alkylsubstitution der Hydroxylamin-Seitenkette führte zu einer weiteren paramagnetischen Verschiebung des Oxim-Stickstoffsignals um etwa 3 ppm (Nummer 4 und 6 der Tabelle 4-3, siehe Abbildung 4-26).

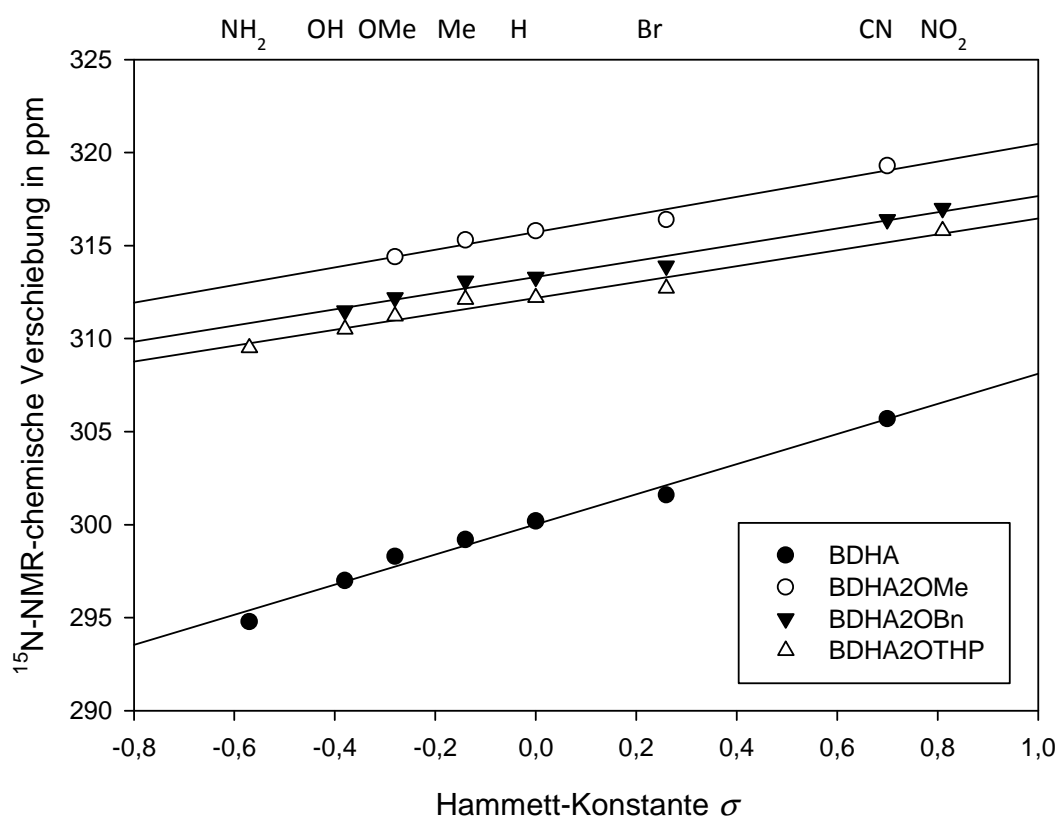


Abbildung 4-26 Graphische Darstellung der Regressionsgeraden der chemischen Verschiebungen des oximartigen Stickstoffatoms in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Hammett-Konstante σ von den symmetrisch substituierten Dihydroxybenzamidinen BDHA **9a-g** (Nummer 1), BDHA2OMe **30c-g** (Nummer 4), BDHA2OBn **32b-h** (Nummer 6) und BDHA2OTHP **27a-f,h** (Nummer 7).

Die chemische Verschiebung des Hydroxylamin-Stickstoffatoms der O -unsubstituierten BDHAs **9** lag bei etwa 128 ppm (Nummer 9). Eine O -Substitution an der zugehörigen Seitenkette führte zu einer paramagnetischen Verschiebung des Signals um etwa 30 ppm (Nummer 11 und 14), während die Alkylsubstitution am vicinalen Sauerstoffatom einen kleineren Einfluss besaß und um etwa 2 ppm

entschirmte (Nummer 10 und 13). Die Substituenteneffekte des Sauerstoffatoms auf die ^{15}N -NMR chemischen Verschiebungen waren additiv (Nummer 4, 6, 7 und 8).

Die cyclischen *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** zeigten eine deutliche paramagnetische Verschiebung der ^{15}N -NMR-Signale, insbesondere der oximartigen Stickstoffatome. Mit einer Differenz von 25-30 ppm zu den unsubstituierten Verbindungen BDHA **9** besaß die Cyclisierung einen weitaus größeren Effekt auf die chemische Verschiebung des betreffenden Stickstoffatoms als die *para*-Substitution oder die *O*-Substitution ohne Ringschluss. Darunter schien eine Spirosubstitution wie in den Verbindungen **13i,k** den Oxim-Stickstoffkern im Vergleich zu BDHA Ace **13d** stärker zu entschirmen und den Hydroxylamin-Stickstoffkern stärker abzuschirmen (Daten nicht gezeigt; siehe Kapitel 7.1.2.14.1 bis 7.1.2.14.3).

Es gab eine überzeugende Korrelation der Hammett-Konstanten σ mit den ^{15}N -NMR chemischen Verschiebungen des oximartigen Stickstoffatoms, ähnlich wie die linearen Beziehungen mit den entsprechenden Atomen in Benzamidinium-Salzen **15**, Benzamidoximen **14**, und Benzonitrilen.^{168,172,173} Die Anstiege der Regressionsgeraden der doppelt gebundenen Stickstoffatome lagen im Bereich von 4-8 ppm (Nummer 1-7). Diese Stickstoffatome waren wenigstens teilweise sp^2 - oder sp -hybridisiert und zeigten elektronische Interaktionen mit dem aromatischen System. Je größer der elektronenziehende Effekt durch den Substituenten in *para*-Position war, desto stärker verschob sich das Oxim- ^{15}N -NMR-Signal paramagnetisch. Dieser Effekt war etwa um die Hälfte abgeschwächt, wenn das Oxim-Sauerstoffatom substituiert vorlag (Nummer 3-7). Die synthetisierten BDHA2OTBDMs **28** fielen auch hier aus der Reihe und gaben keine signifikante Korrelation, da ein abweichendes NMR-Lösungsmittel verwendet wurde und die gewonnenen Ergebnisse deswegen schlecht vergleichbar waren (Nummer 8). Da die chemischen Verschiebungen einiger Stickstoffkerne, beispielsweise die oximartigen ^{15}N -NMR chemischen Verschiebungen von BDHAOMe **31'c-g** und BDHAOBn **10'b,f,g** nicht detektiert werden konnten, fehlt die Korrelation für BDHAOMe **31'c-g**. Von BDHAOBn **10'** wurde die Korrelation mit nur 3 Werten ($n = 3$) durchgeführt.

Das hydroxylaminartige Stickstoffatom war durch den Substituenten in *para*-Position gar nicht oder nur schwach beeinflussbar. Es gab keine signifikante Korrelation mit den Hammett-Konstanten σ (Nummer 9-17). Auch konnte keine weitere Korrelation, beispielsweise mit den $^1J_{\text{N,H}}$ -Kopplungskonstanten der Hydroxylamin-Stickstoffatome oder der diastereomeren Aufspaltung von BDHA2OTHPs **27** gefunden werden. Generell war der diastereomere Shift der Hydroxylamin-Stickstoffkerne der BDHA2OTHPs **27** aber größer als der der oximartigen Stickstoffatome dieser Verbindungen.

4.8.5 ^{29}Si -NMR-Korrelationen

Die synthetisierten *O,O'*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine (**28a,b,e,h**) konnten neben der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-spektroskopischen Untersuchung auch ^{29}Si -NMR-spektroskopisch vermessen werden. Aufgrund der hervorragenden Löslichkeitseigenschaften in lipophilen Solvenzien wurden alle NMR-Messungen der Verbindungen in CDCl_3 durchgeführt.

Die Korrelation des Siliziumatoms der Oxim-Seitenkette mit den Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten war mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 > 0.9$ signifikant (siehe Tabelle 4-4, Nummer 1). Das Siliziumatom der Hydroxylamin-Seitenkette zeigte hingegen keinen linearen Zusammenhang mit den elektronischen Effekten der *para*-Substituenten des Aromaten (Nummer 2).

Tabelle 4-4 Korrelationen der ^{29}Si -NMR chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppen der TBDMS-geschützten N,N' -Dihydroxybenzamidine **28a,b,e,h** in CDCl_3 mit den Hammett-Konstanten σ .

Nummer	funktionelle Gruppe	Verbindung	Korrelation	$r^2; (n)$
1	Si (Oxim-Seitenkette)	BDHA2OTBDMS 28a,b,e,h	$\delta(\sigma) = 1.59 \sigma + 27.7$	0.927 ($n = 4$)
2	Si (Hydroxylamin-Seitenkette)	BDHA2OTBDMS 28a,b,e,h	$\delta(\sigma) = 0.74 \sigma + 29.9$	0.627 ($n = 4$)

Obwohl hier mit CDCl_3 ein anderes NMR-Lösungsmittel verwendet wurde, ähnelten die Korrelationsgeraden beider Siliziumatome denen der Kohlenstoffatome an der entsprechenden Position von methylierten, benzylierten und tetrahydropyranylierten Verbindungen (siehe Abbildung 4-27, Vergleich Abbildung 4-23). Auch die chemischen Verschiebungen der Siliziumatome verhielten sich gegensätzlich zu den Protonen der daran gebundenen Methyl- und *tert*-Butylgruppen, denn die chemische Verschiebung des ^{29}Si -Atoms der Oxim-Seitenkette lag diamagnetisch zu der des Siliziumatoms der Hydroxylamin-Seitenkette.

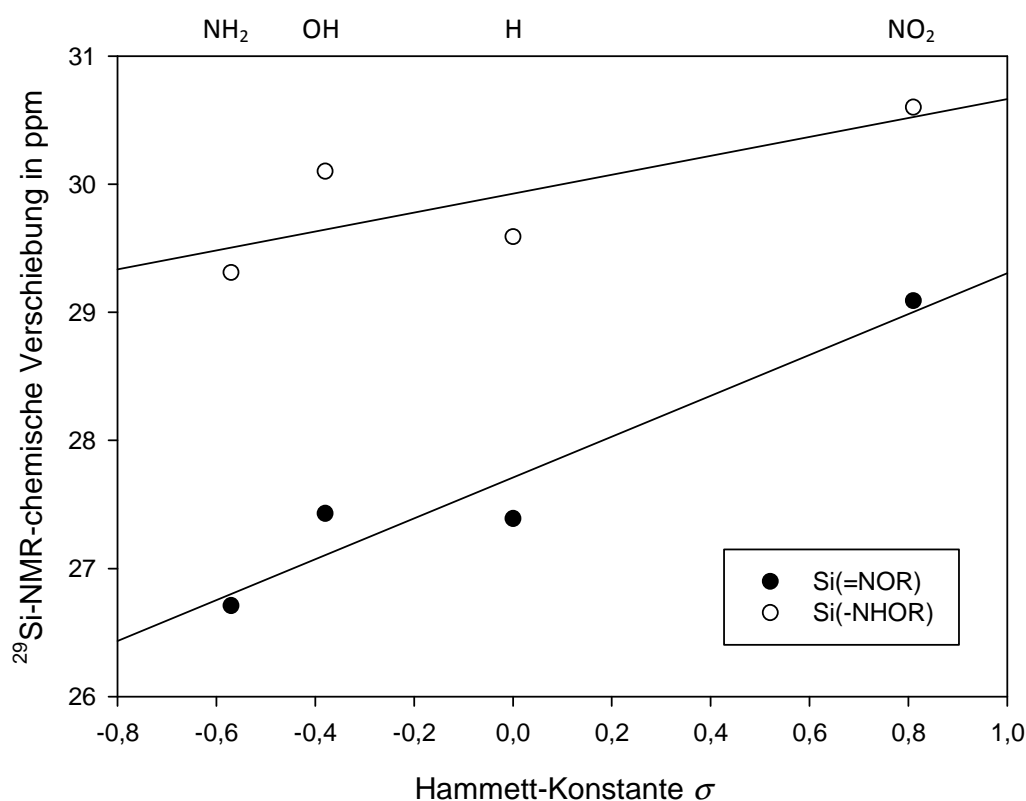


Abbildung 4-27 Graphische Darstellung der Regressionsgeraden der ^{29}Si -NMR-chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppe von BDHA2OTBDMS **28a,b,e,h** in CDCl_3 mit den Hammett-Konstanten σ .

4.8.6 Berechnung der Hammett-Konstanten σ der unterschiedlichen Dihydroxyamidin-Funktionen

Die relativen Beiträge elektronenziehender und -schiebender Substituenten zur Elektronendichte eines Aromaten sind immer gleich und werden als Hammett-Konstanten σ angegeben. Für viele Substituenten wurden bereits Hammett-Konstanten σ empirisch bestimmt und können nach-

geschlagen werden, ebenso wie die Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten aus Tabelle 3-1.¹²⁰

Für die Dihydroxyamidin-Funktionen wurden bisher keine Hammett-Konstanten σ bestimmt, da ein Großteil der Verbindungen und der funktionellen Gruppen bisher nicht synthetisiert wurde. Anstelle der üblichen empirischen Bestimmung von σ sollen sich die Literaturdatenbanken zu Nutze gemacht und die Hammett-Konstanten σ indirekt bestimmt werden.¹⁷⁴

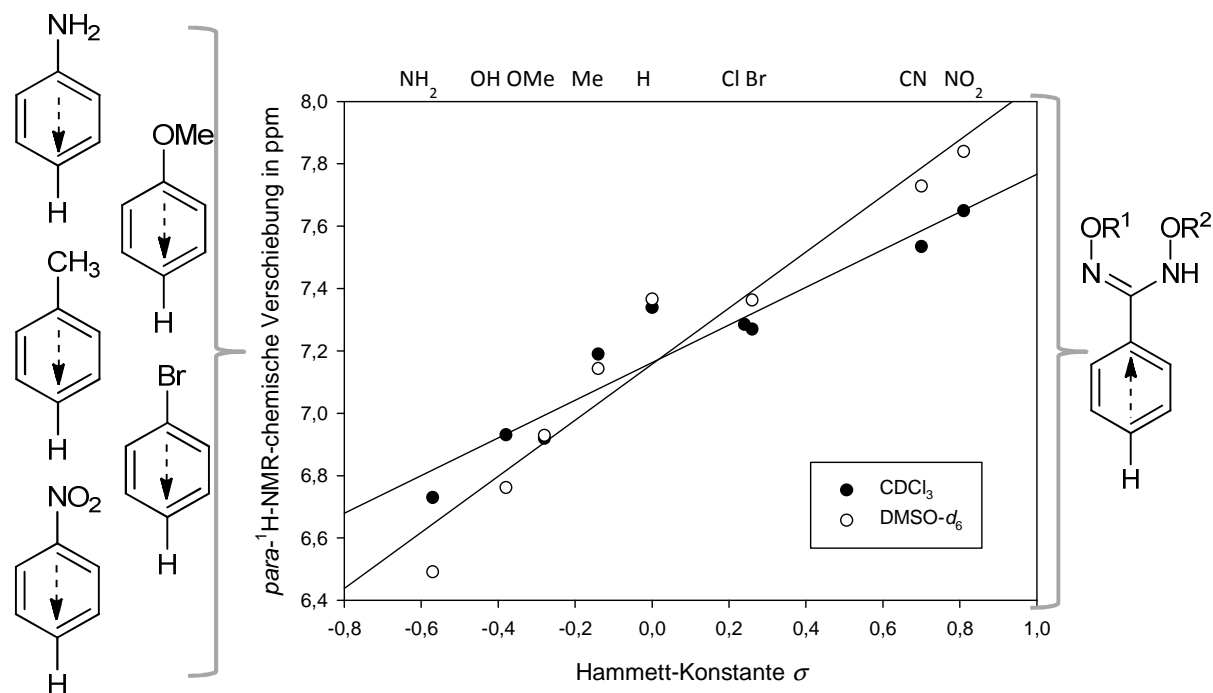


Abbildung 4-28 Regressionsgeraden der aus der Literatur entnommen chemischen Verschiebungen δ der *para*-ständigen ^1H -Atome monosubstituierter Aromaten in $\text{DMSO}-d_6$ und CDCl_3 mit den Hammett-Konstanten σ der Substituenten.

Dazu wurden die chemischen Verschiebungen der zu dem Substituenten *para*-ständigen ^1H -Atome des Benzolrings aus der Literatur entnommen oder bei Fehlen der Daten selbst vermessen und gegen die bekannten Hammett-Konstanten σ für die *para*-Position in einem Diagramm eingetragen (siehe Abbildung 4-28). Von den so erhaltenen Regressionsgeraden waren die Geradengleichungen zu bestimmen (siehe Tabelle 4-5). Mit Korrelationskoeffizienten von $r^2 > 0.9$ konnte von einer direkten Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von σ ausgegangen werden. Die durch die Vermessung der substituierten Benzole in $\text{DMSO}-d_6$ erhaltenen Daten wiesen eine etwas deutlichere Abhängigkeit auf als die gewonnenen Daten aus CDCl_3 . Durch Umformen der Geradengleichung nach der Hammett-Konstante σ und Einsetzen der ermittelten chemischen Verschiebungen δ der in *para*-Position der funktionellen Gruppen der *p*-unsubstituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine befindlichen ^1H -Atome konnten anschließend indirekt die Hammett-Konstanten σ der funktionellen Gruppen bestimmt werden (siehe Abbildung 4-28 und Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5 Korrelationsgleichungen der aus der Literatur entnommen chemischen Verschiebungen δ der *para*-ständigen ^1H -Atome monosubstituierter Aromaten in $\text{DMSO}-d_6$ und CDCl_3 mit den Hammett-Konstanten σ der Substituenten.

Nummer	Lösungsmittel	Korrelation	umgeformte Korrelation	$r^2; (n)$
1	CDCl_3	$\delta(\sigma) = 0.605 \sigma + 7.16$	$\sigma(\delta) = (\delta - 7.16)/0.605$	0.913 ($n = 9$)
2	$\text{DMSO}-d_6$	$\delta(\sigma) = 0.900 \sigma + 7.16$	$\sigma(\delta) = (\delta - 7.16)/0.900$	0.941 ($n = 8$)

Da die chemischen Verschiebungen δ der meisten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine aufgrund der deutlich besseren Löslichkeit in $\text{DMSO}-d_6$ solvatisiert und NMR-spektroskopisch vermessen wurden, konnte den aus der $\text{DMSO}-d_6$ -Geradengleichung erhaltenen Hammett-Konstanten σ mehr Bedeutung beigemessen werden (siehe Tabelle 4-5, Nummer 2). Sinnvoll war das Ausrechnen von σ nur aus den Korrelationen im gleichen NMR-Lösungsmittel, weswegen einige Ergebnisse der Tabelle 4-6 eingeklammert sind. Um aus den Korrelationsgeraden Rückschlüsse auf die Hammett-Konstanten σ ziehen zu können, wäre auch hier das Lösungsmittel Wasser am geeignetsten, da σ ursprünglich in wässrigen Medien durch die unterschiedliche Ionisierbarkeit von substituierter Benzoesäure bestimmt wurde.¹⁷⁵ Da die erhaltenen Korrelationen aber signifikant waren, konnte eine durchaus sinnvolle annähernde Berechnung der Hammett-Konstanten σ der funktionellen Gruppen erfolgen.

Tabelle 4-6 Berechnete Hammett-Konstanten σ der funktionellen Gruppen aus den chemischen Verschiebungen δ der *para*-ständigen ^1H -Atome der synthetisierten *para*-unsubstituierten Dihydroxybenzamidine in $\text{DMSO}-d_6$ und den umgeformten Korrelationsgleichungen aus Tabelle 4-5. *: abweichend wurde das NMR-Lösungsmittel CDCl_3 verwendet.

Nummer	Verbindung	$\delta(p\text{-}^1\text{H})$ in ppm	ber. σ in CDCl_3	ber. σ in $\text{DMSO}-d_6$
1	BDHA 9	7.37	(0.34)	0.24
2	BDHAOMe 31	7.39	(0.38)	0.26
3	BDHAOMe 31'	7.39	(0.38)	0.26
4	BDHA2OMe 30	7.42	(0.43)	0.29
5	BDHAOBn 10	7.40	(0.39)	0.27
6	BDHAOBn 10'	7.13	(-0.05)	-0.03
7	BDHA2OBn 32	7.42	(0.43)	0.29
8	BDHA2OTHP 27	7.43	(0.44)	0.30
9*	BDHA2OTBDMS 28	7.37	0.34	(0.24)
10	BDHAAce 13d	7.48	(0.53)	0.36
11	BDHACypent 13i	7.49	(0.54)	0.37
12	BDHACyhex 13k	7.48	(0.53)	0.36
13	BA*HCl 15	7.74	(0.96)	0.65
14	BAO 14	7.37	(0.34)	0.23

Die erhaltenen Hammett-Konstanten σ für die in *para*-Position befindlichen funktionellen Gruppen waren fast alle positiv, würden also zu einer schwachen Entschirmung der Substituenten in *para*-Stellung führen. Der berechnete schwache Elektronenzug der Dihydroxyamidin-funktionellen Gruppen entsprach in etwa dem eines Brom-Substituenten mit $\sigma = 0.26$ (Nummer 1-9, Tabelle 4-6). Auch eine Amidoximsubstitution am Aromaten besaß diesen Effekt (Nummer 14). Die cyclischen Dihydroxyamidin-Gruppen schienen die Elektronendichte des aromatischen Ringsystems mit einer berechneten Hammett-Konstante σ von etwa 0.36 noch etwas stärker zu verringern. Am stärksten entschirmend bzw. elektronenziehend wirkte aber wie erwartet ein Amidinium-Substituent, welcher vergleichbar mit einer Nitril-Gruppe in *para*-Position war (Nummer 13).

Die auf diese Weise bestimmten Hammett-Konstanten σ könnten eingesetzt werden, um die Effekte der funktionellen Dihydroxyamidin-Gruppen auf den Substituenten in *para*-Position des Aromaten vorherzusagen. Dies besitzt eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung von komplexeren aromatischen Dihydroxyamidin-Prodrugs.

4.8.7 Zusammenfassung

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Korrelationen der verschiedenen Atome der Oxim-Seitenkette mit den Hammett-Konstanten der Substituenten in *para*-Position des Aromaten meist signifikanter und immer empfindlicher sind, als die entsprechenden Korrelationen mit den Atomen der Hydroxylamin-Seitenkette. Dies kann den zugehörigen Korrelationskoeffizienten r^2 und den Anstiegen der Regressionsgeraden entnommen werden.

Die absoluten Werte, also die y-Achsen-Abschnitte der chemischen Verschiebungen verhalten sich zwischen den Atomen unterschiedlich: ^{15}N - und ^1H -Atomkerne liefern an der Oxim-Seitenkette größere δ im Vergleich zu den entsprechenden Atomen der Hydroxylamin-Seitenkette während die Reihenfolge bei den ^{13}C - und ^{29}Si -Atomkernen genau entgegengesetzt verläuft.

Mit Hilfe von NMR-Spektren einfach substituierter Aromaten konnten die theoretischen Hammett-Konstanten σ der verschiedenen synthetisierten Dihydroxybenzamidin-Funktionen berechnet werden. Die funktionellen Gruppen besitzen einen leicht elektronenziehenden Effekt.

5 BIOAKTIVIERUNGSUNTERSUCHUNGEN

5.1 Einleitung

5.1.1 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

Die Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) kommen in allen Lebensformen vor und katalysieren überwiegend Oxidationsreaktionen von diversen Endobiotika sowie Xenobiotika.¹⁷⁶ Als Hämprotein besitzen CYP450-Enzyme Eisen als Zentralatom der prosthetischen Gruppe. Die reduzierte Form kann Kohlenmonoxid (CO) komplexieren und zu einem charakteristischen Absorptionsmaximum des Proteins bei 450 nm führen, was namensgebend für das Enzym war.¹⁷⁷ Eine Besonderheit der CYP450-Enzyme gegenüber anderen Hämproteinen (z.B. Hämoglobin, Cytochrom-b, Peroxidasen) besteht in der Bindung eines Thiois zum Zentralatom Eisen anstelle der sonst üblichen Komplexierung über einen Imidazol-Stickstoff aus Histidin. Durch den Schwefel-Liganden aus der Aminosäure Cystein wird die Elektronendichte des anhängenden Porphyrinrings derart verändert, dass eine Aktivierung von molekularem Sauerstoff erfolgen kann. Um diesen Sauerstoff auf ein angelagertes Substrat übertragen zu können, ist ein Elektronentransfer durch die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, welche FAD und FMN als prosthetische Gruppe besitzt, vonnöten. Es werden zahlreiche Reaktionen durch CYP450 katalysiert.¹⁷⁶ So sind sie unter anderem verantwortlich für die Hydroxylierung aromatischer und aliphatischer Stoffe, für die *N*- und *O*-Desalkylierung von tertiären Aminen und *O*-methylierten Substraten und für die β -Spaltung von Hydroperoxiden.¹⁷⁸ Die Nomenklatur der CYP450-Superfamilie basiert auf der Einteilung in Familien und Sub-Familien anhand der Sequenzähnlichkeiten der Gene.¹⁷⁶ Die Cytochrom P450-Enzyme kommen beim Menschen in vielen unterschiedlichen Organen wie der Leber, dem Darm, der Nebenniere und Niere, der Placenta und den Ovarien vor und sind dort membrangebunden vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER), aber auch in Mitochondrien lokalisiert.

Das CYP450-Enzymsystem besitzt vielfältige essenzielle Funktionen im Organismus:

- Cholesterolsynthese,
- Umwandlung von Cholesterol zu Androgenen, Estrogenen und Gluco- und Mineralocorticoiden,
- Synthese und Abbau von Prostaglandinen und anderen ungesättigten Fettsäuren,
- Umwandlung von Vitamin-D₃ in ihre aktive Form,
- Metabolisierung von Cholesterol zu Gallensäuren und
- Biotransformation diverser Xenobiotika.¹⁷⁶

Die arzneistoffmetabolisierenden CYP450-Enzyme befinden sich überwiegend im ER der Leber, aber auch in der Lunge, im Darm, in der Niere, im Gehirn und in der Haut und sind für die folgenden Untersuchungen von besonderer Bedeutung. Die relativen Häufigkeiten der verschiedenen CYP450-Isoenzyme im Vergleich zu ihrem Anteil am Fremdstoffmetabolismus sind in Abbildung 5-1

dargestellt.¹⁷⁹ Die Dominanz des CYP3A4 hinsichtlich des mengenmäßigen Anteils, aber besonders hinsichtlich der metabolisierenden Funktion, ist in der Abbildung 5-1 deutlich zu erkennen.

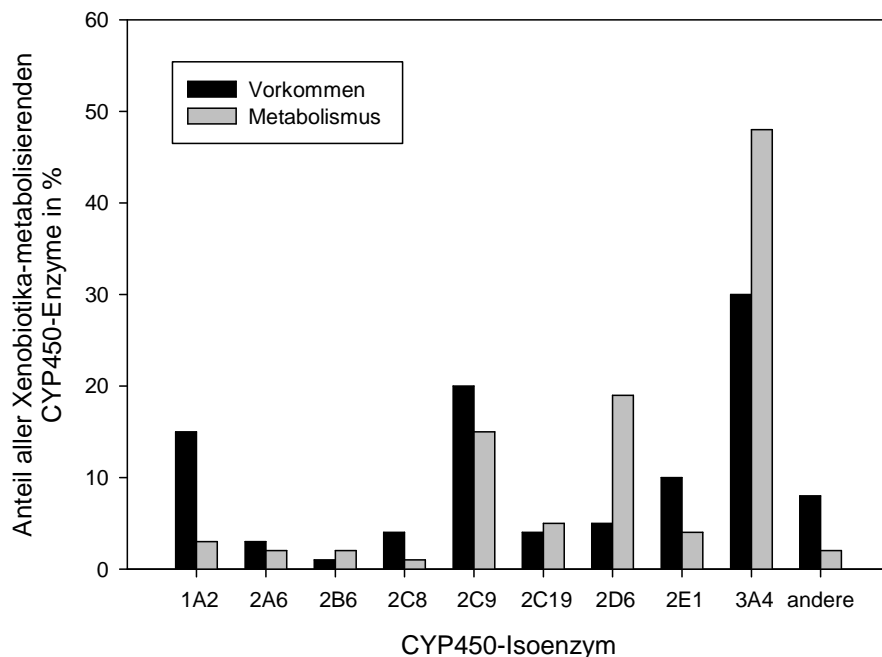


Abbildung 5-1 Darstellung der bedeutendsten Xenobiotika-metabolisierenden CYP450-Isoenzyme, deren mengenmäßiger Anteil an allen fremdstoffmetabolisierenden CYP450-Enzymen (Vorkommen) und deren Beitrag zum Metabolismus von Fremdstoffen (Metabolismus).¹⁷⁹

5.1.2 Das N-reduktive mARC-Enzymsystem

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente mARC (*mitochondrial Amidoxime Reducing Component*) besitzt die Eigenschaft, N-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren und ist auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Es ist neben der Xanthinoxidase, der Sulfinoxidase und der Aldehydoxidase eines von vier molybdänhaltigen Enzymen in Säugetieren.^{83,87,180} Das humane Genom codiert für zwei mARC-Proteine (mARC1 und mARC2), die eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen.¹⁸¹ Beide mARC-Proteine besitzen die Fähigkeit, im N-reduktiven System Reduktionsreaktionen zu katalysieren.^{50,181,182} Für die N-reduktive Katalyse benötigt das mARC-Enzym außerdem als Elektronentransportsystem mitochondriales Cytochrom-b5 (CYB5B) und die NADH-Cytochrom-b5-Reduktase (CYB5R) (siehe Abbildung 5-2).^{89,90,182} Die N-reduktive Aktivität des Dreikomponenten-Enzymsystems ist dabei auf den Molybdän-Cofaktor von mARC und auf das Häm des CYB5B angewiesen.^{181,182}

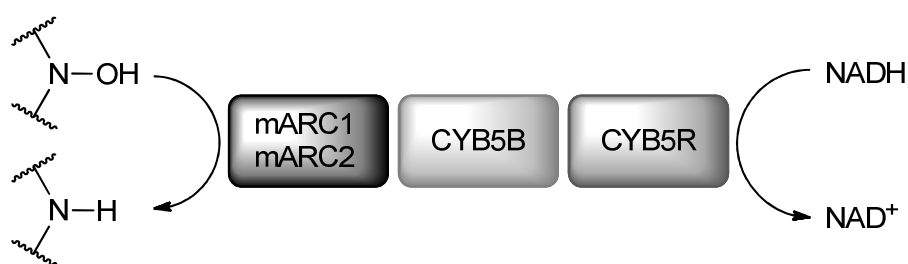


Abbildung 5-2 Das *N*-reduktive Dreikomponenten-Enzymsystem mARC in menschlichen Zellen.

Die Bedeutung von mARC für den Organismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Kristallstruktur des Enzyms fehlt bislang, was die Forschung an der Funktion des Enzymsystems erschwert. Es wurde ein Zusammenhang von mARC und dem Lipidstoffwechsel beschrieben.^{89,183} Denkbar ist außerdem die Involvierung des Enzymsystems an der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten DNA-Basen.⁸⁸ Basierend auf der Fähigkeit, *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin als Vorläufer des gefäßerweiternden Stickstoffmonoxids (NO) zu reduzieren, wird weiterhin angenommen, dass mARC an der Regulation der L-Arginin-abhängigen NO-Synthese beteiligt sein könnte.⁹⁰ Durch erfolgte Expressionsanalysen konnten weitere Hinweise zur physiologischen Bedeutung von mARC erhalten werden. So wurde eine Herunterregulation von mARC2 in humanem Darmkrebsgewebe beobachtet,¹⁸⁴ während mARC2 in diabetischen Tiermodellen sowie in Zellkultur unter erhöhtem Glucosezusatz überexprimiert war.^{87,185} Allgemein anerkannt ist, dass das mARC-haltige Enzymsystem für die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs verantwortlich ist, wie an Pentamidin-Diamidoxim, anderen Amidoximen, *N*-Hydroxyaminohydrazonen und Sulfhydroxamsäuren gezeigt werden konnte.^{50,85,86}

Mit seinen reduzierenden Eigenschaften stellt das mARC-Enzymsystem ein Gegenstück zu den CYP450-Enzymen und den flavinhaltigen Monooxygenasen, welche Oxidationsreaktionen an Stickstofffunktionen katalysieren, dar.⁸⁷ Die Rückreaktion aller *N*-oxygenierter Strukturen wird effektiv durch mARC-Enzyme vollzogen.

5.2 *In vitro*-Untersuchung der Bioaktivierung von ausgewählten *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

5.2.1 Einleitung

Die Metabolisierung der neu synthetisierten Derivate *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) und 5,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**13d**) wurde bisher nicht untersucht. Ob die Verbindungen sich als Prodrugs eignen und welche pharmakokinetischen Eigenschaften sie besitzen, ist bislang unklar. Wünschenswert wäre eine langsame Umsetzung zur Modell-Wirkform Benzamidin (**15**), sodass ein Retard-Arzneimittel-Prinzip ohne aufwändige und empfindliche Arzneimittelformulierung Anwendung in Wirkstoffen finden könnte. Toxische Plasmakonzentrationsspitzen von den oft hochwirksamen amidinhaltigen Wirkstoffen könnten auf diesem Wege verhindert werden.

5.2.2 Zielsetzung

Durch geeignete Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und in welchem Maße der Metabolit Benzamidoxim (**14**) und die Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) aus den modellhaften Prodrugs

N,N'-Dihydroxybenzamidin (**9e**), dem disubstituierten Derivat *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) und der cyclischen Verbindung 5,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**13d**) entstehen.

Dafür sollten Inkubationen der Substrate mit Schweinelebermitochondrien (SLMt), welche das mARC-Enzymsystem enthalten, durchgeführt werden. Ließen sich die Metabolite BAO **14** und BA **15** nachweisen, wurde das Substrat allein durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem zu den Abbauprodukten umgesetzt. Geringe Verunreinigungen beispielsweise mit Schweinelebermikrosomen konnten hier das Ergebnis verfälschen. Außerdem könnten andere Enzyme der Mitochondrien und Mikrosomen verantwortlich für eine Metabolisierung sein und zu einer falschen Schlussfolgerung führen. Daher sollten zusätzlich die Umsetzungen durch die rekombinanten humanen Proteine mARC1 und mARC2 unter Zusatz von CYB5B und CYB5R durchgeführt werden.

Weiterhin sollten Inkubationen mit Cytochrom P450-haltigen Schweinelebermikrosomen (SLMs) Aufschluss geben, ob diese für die *O*-Desalkylierungsreaktionen der substituierten BDHAs verantwortlich sein könnten. Durch den Vergleich der Ergebnisse mit den SLMt-Bioaktivierungsuntersuchungen und der simultanen Inkubation der Modellsubstrate mit SLMt und SLMs sollte analysiert werden, ob die *O*-Desalkylierung auch allein durch das mARC-Enzymsystem stattfinden konnte, oder ob das CYP450-Enzymsystem für die Aktivierung der Modell-Prodrugs zur Wirkform vorhanden sein musste.

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Proteine sollten parallele Inkubationen mit Benzamidoxim (**14**) durchgeführt werden. Durch Inkubation mit Hitze-denaturierten Proteinen wurde geprüft, ob auch ohne enzymatische Aktivität der Proteine Reaktionsprodukte gebildet würden. Eine Kontrolle ohne Substrat sollte die fehlerhafte Detektion von Metaboliten durch Puffer- oder Enzymbestandteile ausschließen.

5.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die für die unterschiedlichen Inkubationen von BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 5-1 zusammenfassend dargestellt. Die Inkubationen fanden im 37 °C Schüttelwasserbad statt und wurden nach 5-minütiger Vorinkubation zum Reaktionsstart mit dem Cosubstrat NADH (bei Umsetzungen mit SLMt) bzw. NADPH (bei Umsetzungen mit SLMs) versetzt. Nach 20 Minuten wurde die Inkubation durch gleichvolumige Zugabe von MeOH/1 % Ameisensäure gestoppt, die Proben geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand der HPLC zugeführt (Methode siehe Kapitel 7.5.6).

Tabelle 5-1 Inkubationsbedingungen von ausgewählten *O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **9e**, **30e** und **13d** mit porcinen Lebermikrosomen und/oder -Mitochondrien bzw. dem rekonstituierten rekombinanten humanen mARC-Enzymsystem.

	SLMt	SLMs	SLMt+SLMs	hmARC1	hmARC2
Substrat	3 mM BDHA 9e / BDHA2OMe 30e / BDHAAce 13d				
Protein	0.1 mg/150 µl SLMt	0.1 mg/150 µl SLMs	je 0.1 mg/150 µl SLMt und SLMs	[hmARC1 bzw. -2 (75 pmol Mo) +CYB5B (75 pmol Häm) +CYB5R (7.5 pmol FAD)]/150 µl	
Medium	100 mM Phosphatpuffer			20 mM MES-Puffer	
pH	pH 6.0	pH 7.4		pH 6.0	
Cosubstrat	1 mM NADH	1 mM NADPH		1 mM NADH	

5.2.3.1 Bioaktivierung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin

Aufgrund der bekannten Instabilität von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) wurden zwei unterschiedliche Wiederfindungen für die beiden bei den Inkubationen verwendeten pH-Werte 6.0 und 7.4 bestimmt. Die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte von BDHA **9e** waren Benzamidoxim (**14**) und Benzamidin (**15**) (siehe Abbildung 5-3).

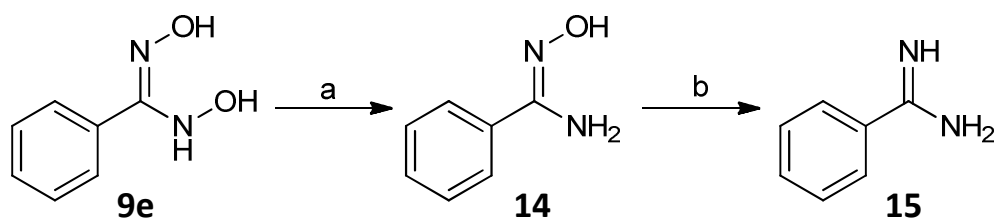


Abbildung 5-3 BDHA **9e** und die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte BAO **14** und BA **15**. Ob a oder b enzymatisch oder nichtenzymatisch verlaufen, war Gegenstand der Inkubationsversuche. Bei enzymatischen Reaktionen sollten die katalysierenden Enzyme festgestellt werden.

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Kalibrierung von BA **15** und BAO **14** lagen bei $r^2 > 0.99$, die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Wiederfindungen bei pH 6.0 und pH 7.4 für BA **15** und BAO **14** neben BDHA **9e** entsprachen ebenfalls $r^2 > 0.99$. Der Korrelationskoeffizient der alternativen Wiederfindung von Benzamidoxim (**14**) ohne BDHA **9e** ergab $r^2 > 0.999$ (siehe Abbildung 5-4, B).

Die Bestimmungsgrenzen für BA **15** bei pH 6.0 und bei pH 7.4 mit einer maximal zulässigen relativen Standardabweichung von 10 % lagen bei 5 µM, für Benzamidoxim (**14**) bei 50 µM (siehe Abbildung 5-4, A). Die Nachweisgrenzen für BA **15** bei pH 6.0 und bei pH 7.4 lagen bei 1 µM und für BAO bei 10 µM. Die alternative Wiederfindung ohne BDHA **9e** ergab für BAO **14** eine Bestimmungsgrenze von 1 µM und eine Nachweisgrenze von 0.5 µM (siehe Abbildung 5-4, B).

Für Benzamidin (**15**) wurde eine Wiederfindungsrate mit BDHA **9e** von 113 % für pH 6.0 und 109 % für pH 7.4 bestimmt. Die Wiederfindungsrate von Benzamidoxim (**14**) wurde mit 109 % für pH 6.0 und 114 % für pH 7.4 ermittelt. Die alternative Wiederfindung ohne BDHA **9e** ergab für Benzamidin (**15**) eine Wiederfindungsrate von 115 %.

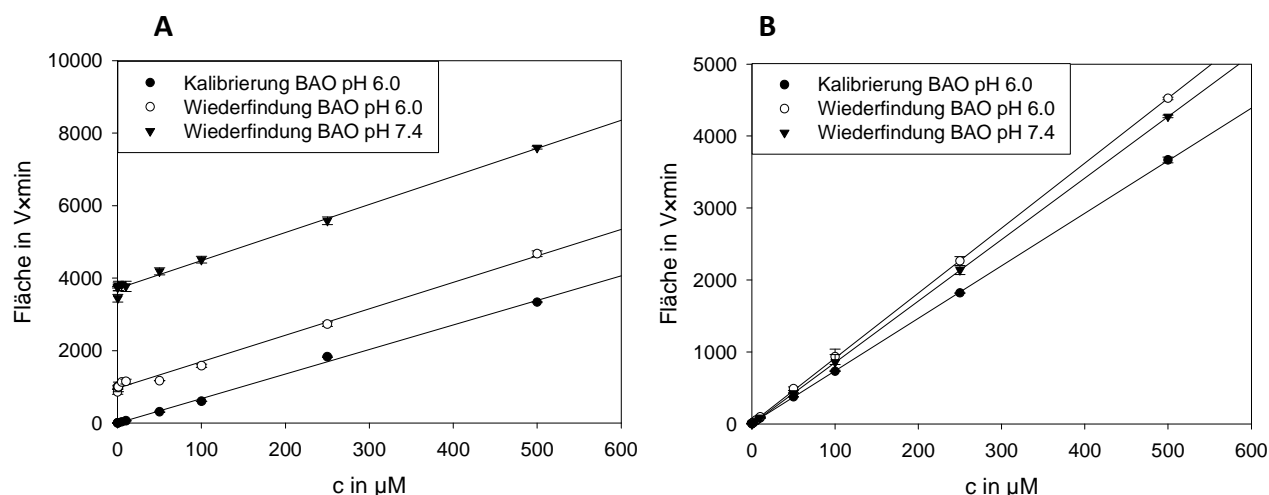


Abbildung 5-4 A: Kalibrierungsgerade von BAO 14 ohne BDHA 9e und Wiederfindungsfunktionen von BAO 14 neben BDHA 9e bei pH 6.0 und pH 7.4 und B: ohne BDHA 9e, pH 6.0 und pH 7.4.

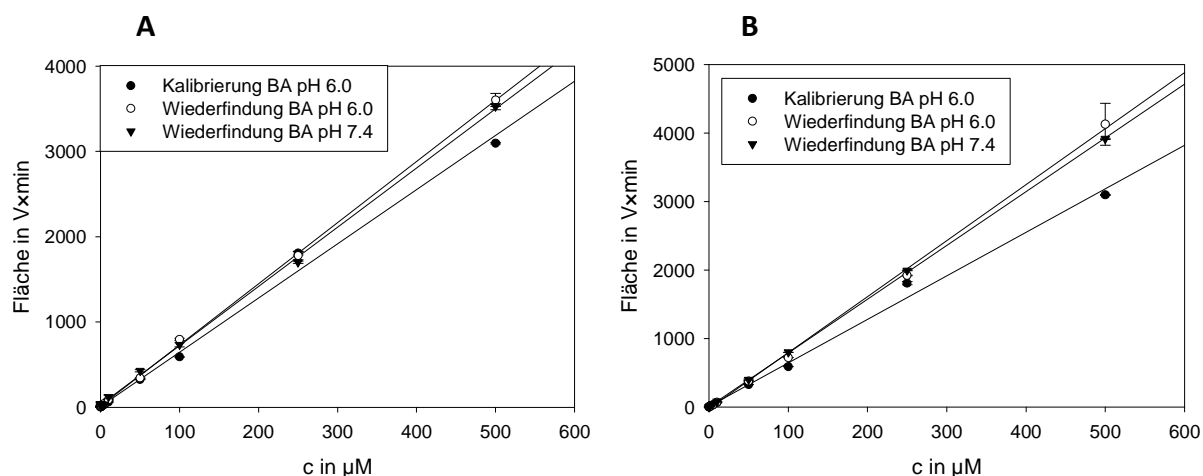


Abbildung 5-5 A: Kalibrierungsgerade von BA 15 ohne BDHA 9e und Wiederfindungsfunktionen von BA 15 neben BDHA 9e bei pH 6.0 und pH 7.4 und B: ohne BDHA 9e, pH 6.0 und pH 7.4.

Problematisch bei diesen Inkubationen war die schlechte Stabilität von Dihydroxybenzamidin **9e**, besonders im neutralen wässrigen Medium (siehe Kapitel 3.1.4.1). Aber auch bei pH 6.0 war die Stabilität von BDHA **9e** nicht gut geeignet für aussagekräftige Ergebnisse aus Versuchen in wässrigen Medien, wie man aus der starken Parallelverschiebung der Kalibrierungs- und Wiederfindungsfunktionen der Abbildung 5-4 A ableiten konnte. Diese kam durch die nichtenzymatische Zersetzung von BDHA **9e** zu BAO **14** im Wässrigen zustande und war im leicht Säuren etwas schwächer ausgeprägt, wie die Stabilitätsuntersuchungen bereits zeigten. In Gegensatz dazu entstand der Metabolit **15** nicht spontan im Puffer, wie dem Vergleich von A und B Abbildung 5-5 entnommen werden konnte. Hier machte es nahezu keinen Unterschied, ob BDHA **9e** vorhanden war, oder nicht. Studien zum Metabolismus von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) wurden bereits *in vitro* und *in vivo* in Schweinen von Reeh [2008] durchgeführt und zeigten die erfolgreiche Aktivierung zur Modell-Wirkform Benzamidin (**15**).⁹¹ Als Referenzsubstanz zu den bisher nicht untersuchten substituierten Dihydroxybenzamidinen **30e** und **13d** unter den etwas veränderten Bedingungen wurde das Substrat **9e** dennoch erneut mit verschiedenen Enzymfraktionen inkubiert.

Die Ergebnisse der Inkubationen des Substrats BDHA **9e** mit den unterschiedlichen Proteinen sind in Abbildung 5-6 graphisch dargestellt. In jedem Inkubationsansatz konnte BA **15** nachgewiesen werden. Auch in den Inkubationsansätzen mit den rekombinanten mARC-Proteinen wurde BA **15** detektiert. Dies deutete auf eine CYP450-unabhängige Aktivierung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) hin.

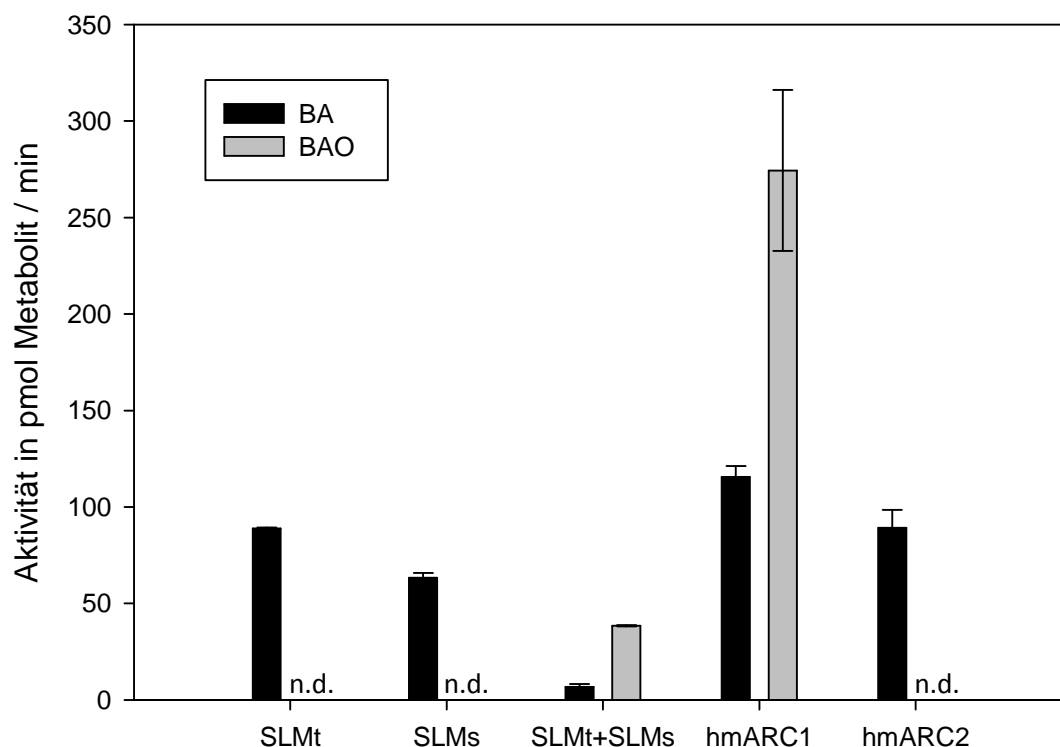


Abbildung 5-6 Enzymatische Metabolisierungsprodukte von BDHA **9e** durch unterschiedliche Zellfraktionen bzw. durch das rekonstituierte rekombinante hmARC-System. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden. n.d. = nicht detektiert.

Die Entstehung von BA **15** nach Zugabe von Schweinelebermitochondrien konnte durch die nichtenzymatische Zersetzung von BDHA **9e** zu BAO **14** im ersten Schritt und anschließender mARC-abhängiger Reduktion erklärt werden. Erstaunlich war aber, dass nach Zugabe von SLMs im Puffer des pH-Werts 7.4 kein BAO **14**, sondern ebenfalls nur **15** nachgewiesen werden konnte. Ein möglicher Grund könnte eine Verunreinigung der Enzymfraktion mit Mitochondrien gewesen sein. Das hierin enthaltene mARC-System könnte das Amidoxim **14** schnell zum Amidin **15** reduziert haben. Allerdings ließ sich Benzamidoxim (**14**) in einem Gemisch aus Mikrosomen und Mitochondrien nachweisen. Wahrscheinlicher war daher, dass die geringe Stabilität von BDHA **9e** Ursache für dieses Phänomen war, sodass aufgrund der Unterschiede in der Verweildauer im Puffer die nichtenzymatische Umsetzung nicht mit ausreichender Genauigkeit über die Wiederfindungsfunktion für die Bioaktivierungsuntersuchungen bestimmt werden konnte. Die geringe Stabilität war an dem großen y-Achsen-Abschnitt erkennbar (siehe Abbildung 5-4, A). Sinnvoll wäre eine gleichzeitige Inkubation von BDHA **9e** ohne Zusatz von Enzymen gewesen, um die exakte nichtenzymatische Umsetzung ermitteln zu können. Auch bei der Wiederfindung hätte dann für alle Werte der Nullwert

abgezogen werden müssen. Weiterhin wäre eine sofortige Vermessung jeder einzelnen Probe nach Inkubation anstelle der Verwendung eines Autosamplers sehr sinnvoll gewesen.

Andererseits lag der physiologische pH-Wert bei 7.4. Eine schnelle nichtenzymatische Umsetzung von BDHA **9e** zu Benzamidoxim (**14**) war demnach auch nach Resorption im Organismus sehr wahrscheinlich. BAO **14** konnte als Prodrug weiterhin gut resorbiert werden und wurde anschließend enzymatisch zu BA **15** umgesetzt. Aufgrund dessen konnte die Berechnung der BAO **14**-Konzentrationen mit einer Wiederfindung, welche ohne BDHA **9e** durchgeführt wurde (siehe Abbildung 5-4, B), realistischere Ergebnisse liefern (siehe Abbildung 5-7).

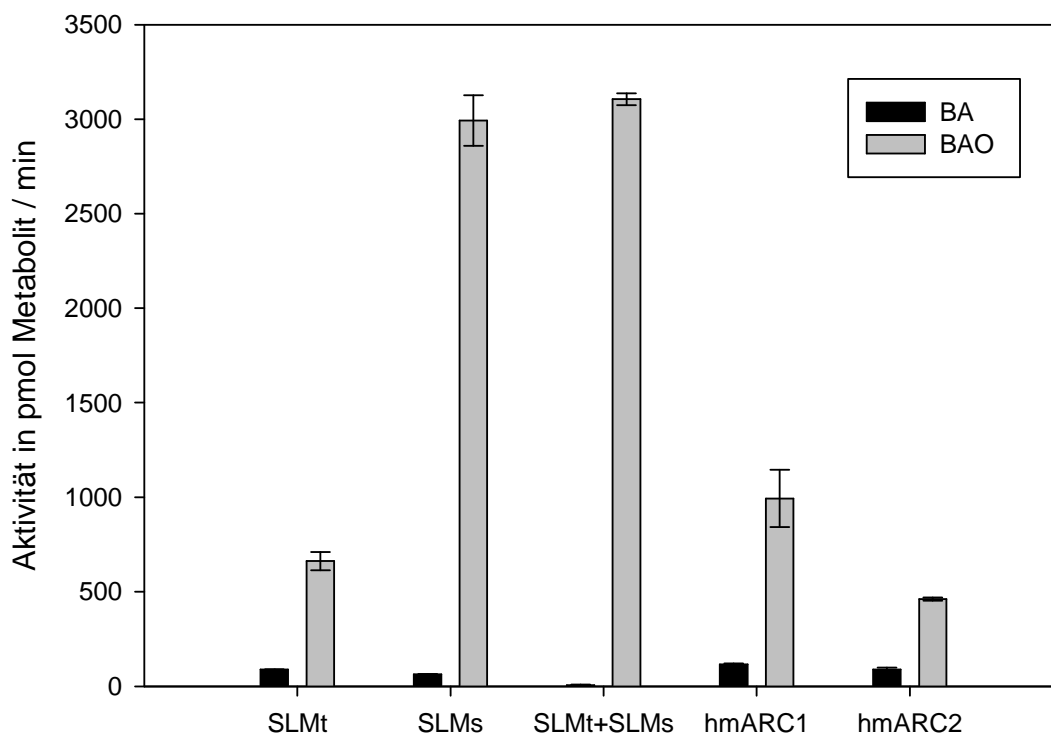


Abbildung 5-7 Enzymatische und nichtenzymatische Umsetzung von BDHA **9e** durch unterschiedliche Zellfraktionen bzw. durch das rekonstituierte rekombinante hmARC-System berechnet mit der Wiederfindung ohne Zusatz von BDHA **9e**. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden.

Die alternative Auswertung der erhaltenen Daten zeigte die enzymatische und nichtenzymatische Entstehung großer Mengen an Benzamidoxim (**14**) nach Zusatz aller Testsysteme (siehe Abbildung 5-7). Besonders viel BAO **14** entstand durch die Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und der gemeinsamen Inkubation mit SLMs und SLMt, welche beide bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt wurden. Offensichtlich spielte der hier verwendete pH-Wert von 7.4 eine entscheidende Rolle, da das Substrat **9e** darin deutlich schneller nichtenzymatisch zu **14** zerfiel als im saureren Medium (pH 6.0). Unter physiologischen Bedingungen ist also eine dominierende nichtenzymatische Reduktion von Dihydroxybenzamidinen zu den entsprechenden Amidoximen zu erwarten.

Die Bildung von Benzamidin (**15**) war allein von der Enzymaktivität der Proteine abhängig und nicht spontan bedingt, wie Abbildung 5-5 bereits demonstrierte. Die Ergebnisse für die BA **15**-Entstehung waren also vertrauenswürdig. Nicht erklärbar war die geringe Bildung von **15** bei der Inkubation von BDHA **9e** mit SLMt und SLMs. Zu erwarten war eine mindestens ebenso starke Metabolisierung wie

bei alleinigem Zusatz von SLMt, da die gleiche Menge an dieser Enzymfraktion eingesetzt wurde. Möglicherweise beeinträchtigte der abweichend verwendete pH-Wert von 7.4 die Aktivität von mARC derart deutlich. Optimal für das Enzymsystem ist ein Umgebungsmedium des pH-Werts 6.0, wie es in den Ansätzen ohne SLMs auch eingesetzt wurde. Allerdings hätte bei der Inkubation mit reinen Schweinelebermikrosomen in diesem Fall deutlich weniger BA **15** entstehen müssen. Folglich wäre eine Wiederholung des Versuches sinnvoll.

5.2.3.2 Bioaktivierung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin

Die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte von Dimethoxy-Benzamidin **30e** waren BDHAOMe **31/31'e**, *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**), *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) Benzamidoxim (**14**) und Benzamidin (**15**) (siehe Abbildung 5-8). Da sich BDHAOMe **31/31'e** und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) instabil in wässrigen Medien verhielten, wurden keine Kalibrierungen und Wiederfindungen mit diesen Verbindungen erstellt. Sie konnten als Metabolisierungsprodukte nicht in der HPLC nachgewiesen werden.

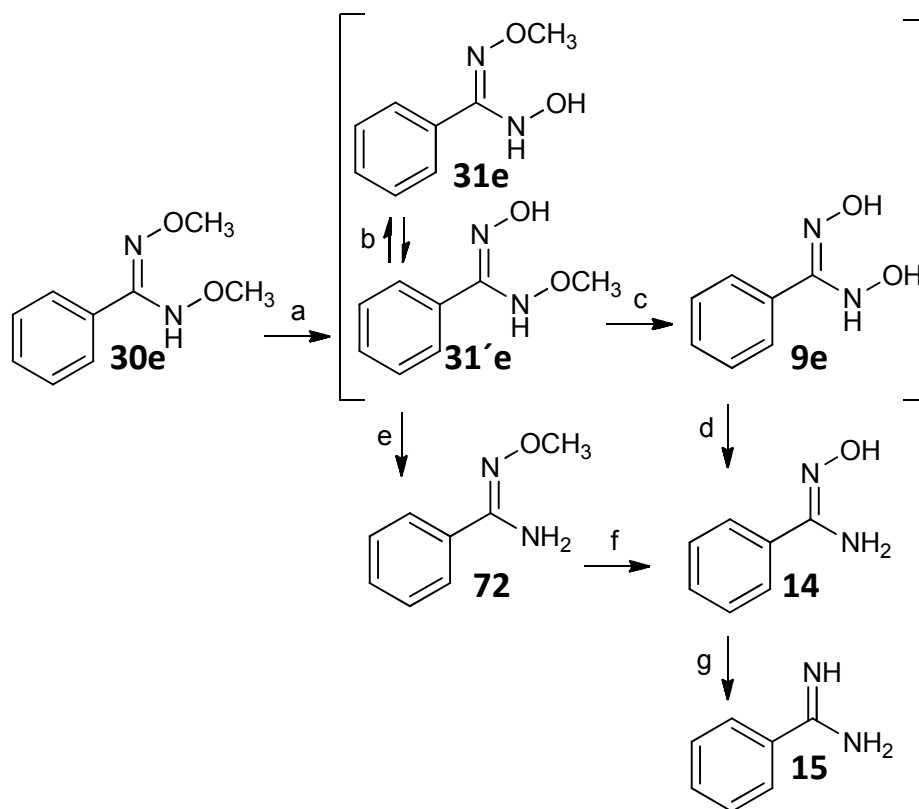


Abbildung 5-8 BDHA2OMe **30e** und die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31e/31'e**), Dihydroxybenzamidin **9e**, *O*-Methylbenzamidoxim (**72**), Benzamidoxim (**14**) und Benzamidin (**15**). a, d, e, f und g stellen mögliche enzymatische und nichtenzymatische Umsetzungswege dar. b: Tautomerie; c: nachgewiesener spontaner Zerfall.

5.2.3.2.1 Versuche mit dem rekonstituierten rekombinanten mARC-System und subzellulären Fraktionen

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Kalibrierung von BA **15**, BAO **14** und BAOMe **72** lagen alle bei $r^2 > 0.99$, die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Wiederfindung entsprachen alle $r^2 > 0.999$.

Die Bestimmungsgrenzen für BA **15**, BAO **14** und BAOMe **72** lagen mit einer maximal zulässigen relativen Standardabweichung von 10 % bei 1 µM, die Nachweisgrenzen aller Verbindungen lagen bei 0.5 µM.

Für Benzamidin (**15**) wurde eine Wiederfindungsrate von 115 % bestimmt. Die Wiederfindungsrate von Benzamidoxim (**14**) wurde mit 124 % ermittelt und bei *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) entsprach sie 107 %.

Im Gegensatz zu Dihydroxybenzamidin **9e** verhielt sich BDHA2OMe **30e** in wässrigen neutralen Puffermedien, wie sie für die Inkubationsversuche verwendet wurden, sehr stabil (siehe Kapitel 3.2.4.1). Eine nichtenzymatische Zersetzung des Dimethoxy-Benzamidins **30e** durch den Puffer trat demnach nicht auf.

Die Ergebnisse der Inkubationen des Substrats BDHA2OMe **30e** mit den unterschiedlichen Proteinen sind in Abbildung 5-9 dargestellt. An den Werten der y-Achse war zu erkennen, dass bei den Inkubationen von dem dimethylierten Dihydroxybenzamidin **30e** im Vergleich zu BDHA **9e** sehr viel weniger Abbauprodukte **14** und **15** entstanden. Obwohl das einfach demethoxylierte Derivat *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) als Metabolisierungsprodukt erwartet wurde, konnte es bei den Versuchen nicht nachgewiesen werden. Auch *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) als theoretisch möglicher Metabolit wurde nicht detektiert. Aufgrund der Instabilität der Verbindung **9e** im wässrigen Medium wurde das Produkt **9e** allerdings auch nicht erwartet.

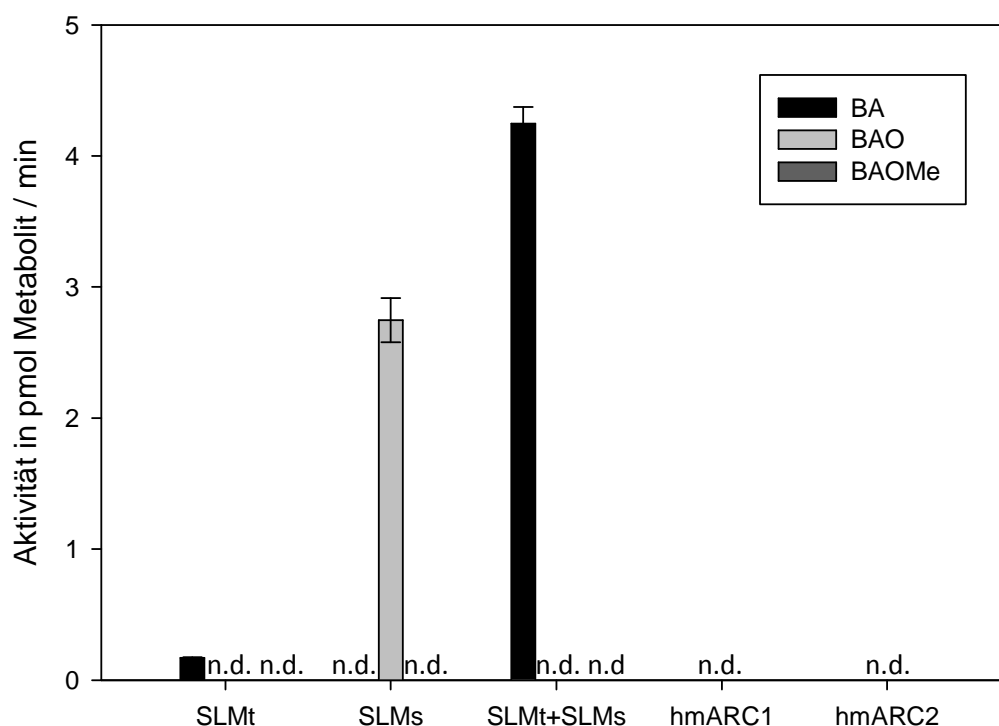


Abbildung 5-9 Enzymatische Metabolisierungsprodukte von BDHA2OMe **30e** durch unterschiedliche Zellfraktionen bzw. durch das rekonstituierte rekombinante hmARC-System. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden. n.d. = nicht detektiert.

Bei der Inkubation von Dimethoxy-Benzamidin **30e** mit Schweinelebermikrosomen konnte das Produkt Benzamidoxim (**14**) detektiert werden (siehe Abbildung 5-9). Weil keine weiteren Zellfraktionen bei Inkubation mit BDHA2OMe **30e** dieses Produkt lieferten, deutete dies darauf hin, dass diese *O*-Demethylierungsreaktionen ausschließlich durch das Cytochrom P450-Enzymsystem katalysiert worden war. BAO **14** als Produkt der *O*-Demethylierung konnte nicht allein durch mARC gebildet werden, wie die Inkubationsansätze mit den rekonstituierten rekombinanten mARC-Enzymsystemen belegten. Nach der Inkubation des Substrats **30e** mit Mitochondrien und Mikrosomen wurde kein BAO **14** nachgewiesen. Stattdessen konnte die Entstehung der Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) detektiert werden. Hieraus ließ sich schließen, dass die *O*-Desalkylierung von BDHA2OMe **30e** der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Metabolisierung war. Alles, was als metabolische Zwischenstufe an Benzamidoxim (**14**) entstand, wurde anscheinend sofort und vollständig durch das mARC-System aus den Mitochondrien zu BA **15** umgesetzt. Bei der Inkubation von Dimethoxy-Benzamidin **30e** mit Schweinelebermitochondrien konnte etwas **15** nachgewiesen werden. BA **15** konnte aber nur entstehen, wenn vorher eine Demethylierung von BDHA2OMe **30e** stattfand, welche offenbar nur durch CYP450-Enzyme katalysiert wurde. Eine Erklärung der Entstehung geringer Mengen an Benzamidin (**15**) nach Inkubation mit SLMt war die leichte Verunreinigung dieser Zellfraktion mit CYP450-haltigen SLMs.

Die Inkubationsansätze mit dem Substrat Dimethoxy-Benzamidin **30e** belegen anschaulich, dass die *O*-Desalkylierung Cytochrom P450-abhängig ablaufen konnte und nicht allein durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem katalysiert wurde. Weiterhin wird deutlich, dass die Reduktion des

Amidoxims **14** zu **15** durch mARC weitaus schneller verlief als die Desalkylierung durch CYP450. Letztere stellte also die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion dar.

5.2.3.2.2 Inkubationen mit Mikrosomen und rekombinanten CYP450-Isoenzymen

Aufgrund der guten Stabilitätseigenschaften und der Struktur als einfachstes *O,O'*-dialkyliertes Dihydroxybenzamidin sollte der Metabolismus von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) näher untersucht werden. Dabei lag der Fokus auf die *O*-Desalkylierungsreaktionen, da die Reduktion von Benzamidoxim (**14**) als metabolisches Zwischenprodukt bereits hinreichend untersucht wurde.

Wie im vorherigen Kapitel 5.2.3.2.1 gezeigt werden konnte, fand die *O*-Demethylierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e** Cytochrom P450-abhängig statt. Demzufolge sollten vertiefende Untersuchungen mit Schweinelebermikrosomen durch eine zeitabhängige Umsetzung über zwei Stunden stattfinden.

Nach 5-minütiger Vorinkubation bei 37 °C und Starten der Reaktion durch Zugabe von NADPH wurden nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten 80 µl-Proben entnommen und mit jeweils 40 µl eiskaltem Acetonitril abgestoppt. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 5-2 aufgelistet.

Tabelle 5-2 Inkubationsbedingungen bei der Metabolisierungsuntersuchung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) mit SLMs bzw. rekombinanten CYP450-Enzymen über zwei Stunden im 37 °C-Schüttelwasserbad.

SLMs		CYP450-Isoenzyme
Substrat	BDHA2OMe 30e	
Protein	0.67 mg/1000 µl SLMs	25 pmol/1000 µl CYP450 (1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9*1, 2C19, 2D6*1, 3A4, 4F2) 25 pmol/1000 µl CYB5 2.5 pmol/1000 µl CYP-R
Medium	100 mM Phosphatpuffer	
pH	pH 7.4	
Cosubstrat	1 mM NADPH	
Probenentnahme	0, 15, 30, 60, 120 min	

Parallel durchgeführte Kontrollansätze enthielten unter Beibehaltung aller anderen Reaktionsbedingungen und -zusätze:

- Kein NADPH, um den Bedarf des Cosubstrats für die Reaktion zu kontrollieren,
- abgekochte Mikrosomen, um die Abhängigkeit der Produkte von der Aktivität der Enzyme zu überprüfen und
- kein Substrat BDHA2OMe **30e**, um eventuell vorhandene Störsignale im Bereich der Metabolite in der HPLC zu erkennen.

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Kalibrierung von BA **15** und BAO **14** lagen bei $r^2 > 0.999$, die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Wiederfindung entsprachen ebenfalls $r^2 > 0.999$.

Die Bestimmungsgrenze für BAO **14** lag mit einer maximal zulässigen relativen Standardabweichung von 10 % bei 0.5 µM, die Bestimmungsgrenze von BA **15** entsprach 1 µM. Die Nachweisgrenze von Benzamidoxim (**14**) lag bei 0.25 µM und die von Benzamidin (**15**) bei 0.5 µM.

Für BA **15** wurde eine Wiederfindungsrate von 123 % bestimmt. Die Wiederfindungsrate von Benzamidoxim (**14**) wurde mit 138 % ermittelt.

In Abbildung 5-10 sind die Ergebnisse der Inkubationen von Dimethoxy-Benzamidin **30e** mit den bedeutendsten Xenobiotika-metabolisierenden CYP450-Isoenzymen und mit CYP450-haltigen SLMs graphisch dargestellt.¹⁸⁶ Für die Vergleichbarkeit der Umsetzungen wurden die Resultate in pmol BAO/pmol CYP450 angegeben. Es sind deutliche Unterschiede in der *O*-Demethylierungsrate zwischen den einzelnen CYP450-Isoenzymen erkennbar. Offensichtlich wurde *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) überwiegend durch die Isoenzyme CYP2B6, CYP2C9*1 und CYP1A2 zu BAO **14** umgesetzt. Die theoretischen Metabolismus-Zwischenstufen *O*-Methyl-*N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**31/31'e**) und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) waren instabil und zersetzen sich überwiegend spontan und nichtenzymatisch zu BAO **14** (siehe Kapitel 3.1.4.1 und 3.2.4.1). Die Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) wurde bei den Inkubationen mit den rekombinanten CYP450-Isoenzymen nicht nachgewiesen, was belegt, dass die Reduktion nur durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem katalysiert werden kann.

Das Isoenzym CYP2B6, welches scheinbar den größten Anteil an der oxidativen BDHA2OMe **30e**-*O*-Demethylierung hatte (siehe Abbildung 5-10), kommt hauptsächlich in der Leber, aber auch in der menschlichen Lunge vor.^{187,188} Mit einem Anteil von nur etwa 1 % aller CYP450-Enzyme gehört CYP2B6 zu den selten vorkommenden Isoenzymen des Menschen (siehe auch Abbildung 5-1).¹⁸⁹ CYP2B6 ist an etwa 3 % der arzneistoffmetabolisierenden Reaktionen des menschlichen Organismus beteiligt, darunter katalysiert es beispielsweise die *N*-Demethylierung von Ketamin und (*S*)-Mephentoin.^{186,189,190} Eine bedeutende Interaktion könnte zwischen dimethoxylierten Prodrugs und dem weit verbreiteten Kontrazeptivum 17 α -Ethinylestradiol bei gemeinsamer Gabe auftreten, da letzteres das CYP2B6-Isoenzym inhibiert, was zu einer verminderten Aktivierung des Prodrugs zur Wirkform führen würde.¹⁹¹ Es gibt allerdings bisher keine Hinweise auf die *in vivo*-Relevanz der Inhibition von CYP2B6 durch Ethinylestradiol. Interessant aber war der Vergleich der Umsetzungsrate des Substrats von CYP2B6, welches üblicherweise für die Bestimmung der spezifischen Aktivität und zur Aktivitätsüberprüfung des Isoenzym eingesetzt wird, mit der Umsetzungsrate des hier getesteten Substrats BDHA2OMe **30e** (siehe Tabelle 5-3). Es wird deutlich, dass die Demethylierung von **30e** mit einer spezifischen Aktivität von $17.5 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2B6}^{-1}$ über dreimal stärker verlief, als die Deethylierung von 7-Ethoxy-4-trifluormethylcoumarin mit einer Umsetzungsrate von $4.9 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2B6}^{-1}$. Somit wäre BDHA2OMe **30e** eine deutlich geeignetere Verbindung zur Überprüfung der Aktivität von CYP2B6. Durch die Bestimmungen der beiden spezifischen Aktivitäten nach der gleichen Inkubationszeit war das Ergebnis dieses Vergleichs hier eindeutig.

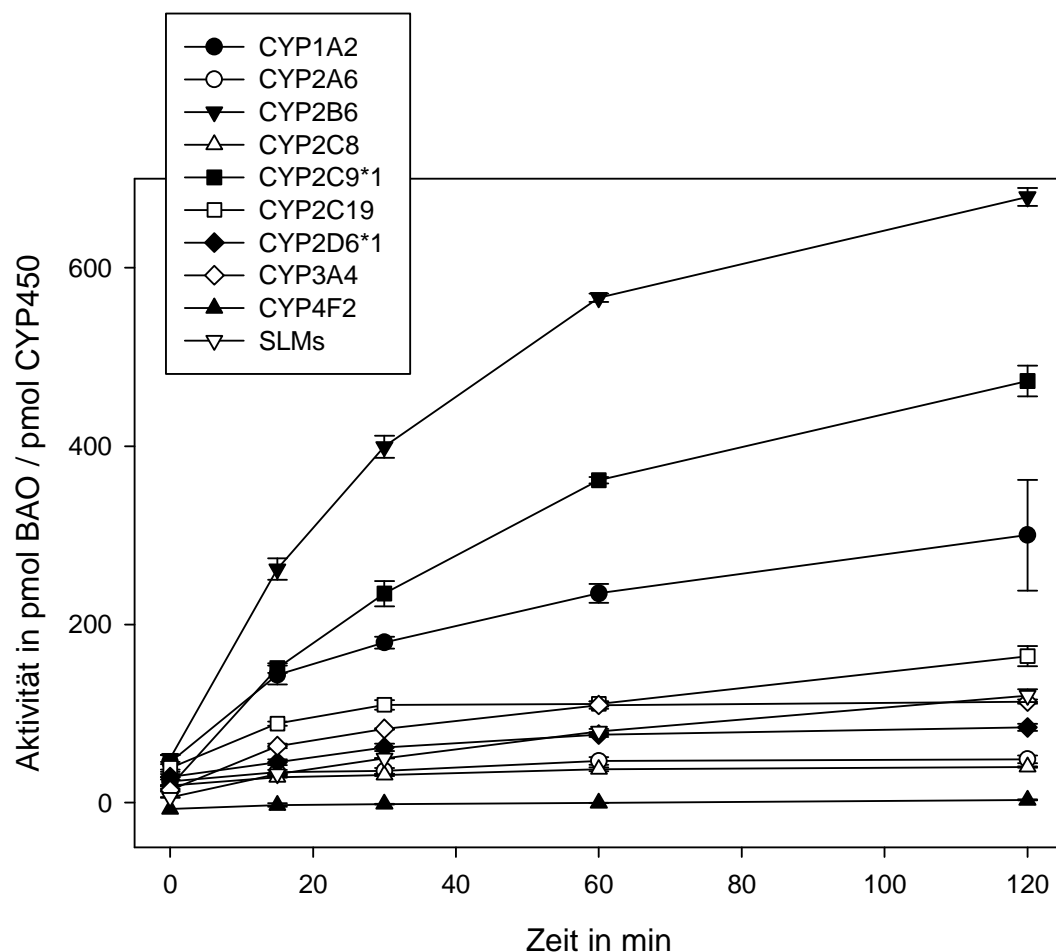


Abbildung 5-10 Zeitabhängige Umsetzung von BDHA2OMe 30e mit unterschiedlichen CYP450-Isoenzymen und mit Schweinelebermikrosomen (SLMs) über zwei Stunden. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden.

Die zweithöchste Demethylierungsaktivität zeigte BDHA2OMe **30e** durch CYP2C9 (siehe Abbildung 5-10). Dieses Isoenzym wird neben CYP3A4 am häufigsten im menschlichen Organismus exprimiert (siehe Abbildung 5-1) und ist an der Metabolisierung zahlreicher Arzneistoffe wie an der 4-Hydroxylierung von Phenytoin und an der Oxidation von Celecoxib, einem Cyclooxygenase (COX)-2-Inhibitor beteiligt.^{192,193} Weiterhin oxidiert CYP2C9 (S)-Warfarin, nicht aber (R)-Warfarin. (R)-Warfarin hemmt diese Konjugation vollständig, jedoch kann (S)-Warfarin im Umkehrschluss die Oxidation von (R)-Warfarin durch CYP1A2 und CYP3A4 nicht hemmen. Die durch Polymorphismus unterschiedlichen genetischen Varianten des CYP2C9*2 und*3 metabolisieren (S)-Warfarin weniger ausgeprägt. Diese Zusammenhänge bedingen die *in vivo* beobachteten Unterschiede in den effektiven und toxischen Dosen von Warfarin.¹⁹⁴ Die durch (R)-Warfarin bedingte CYP2C9-Inhibition könnte ebenfalls zu Wechselwirkungen mit dimethoxylierten Amidin-Prodrugs führen, vorausgesetzt andere *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxyamidine werden ebenfalls über dieses Isoenzym aktiviert. Im Vergleich zur Umsetzung des Referenzsubstrats, welches für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Isoenzym CYP2C9*1 eingesetzt wird, war die Umsetzung von BDHA2OMe **30e** allerdings eher gering. Das Substrat **30e** wurde mit $10.1 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2C9*1}^{-1}$ etwa ein viertel so effektiv demethyliert, wie die Referenzverbindung Diclofenac mit $40 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2C9*1}^{-1}$ hydroxyliert wurde (siehe Tabelle 5-3).

Außerdem wurde BDHA2OMe **30e** in hohem Maße durch CYP1A2 metabolisiert und damit aktiviert (siehe Abbildung 5-10). Dieses Isoenzym kommt in sehr unterschiedlichem Ausmaß im Menschen vor, liegt aber im Mittel bei 10-15 % aller CYP450-Enzyme und zählt somit zu den häufig vorkommenden Isoenzymen.¹⁸⁶ Es werden eine Reihe von Arzneistoffen durch CYP1A2 metabolisiert, wenngleich der Anteil des Isoenzym am Gesamtmetabolismus von CYP450 eher gering ausfällt (siehe Abbildung 5-1). CYP1A2 katalysiert die Inaktivierungen von Coffein und von dem strukturell ähnlichen Antiasthmikum Theophyllin. Dies erklärt die unterschiedliche Effektivität der Verbindungen beim Menschen, da diese auf die interindividuell variierende Expression der polymorphen CYP1A2-codierenden Gene und somit auf die verschieden stark ausgeprägte Metabolisierung der Verbindungen zurückzuführen ist.¹⁹⁵ Eine unterschiedlich effektive Aktivierung von Dimethoxyamidin-Prodrugs durch die stark differierende Expression von CYP1A2 im Menschen könnte möglicherweise ebenso beobachtet werden. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität von CYP1A2 wird üblicherweise Phenacetin eingesetzt. Diese Referenzverbindung wird mit $30 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP1A2}^{-1}$ etwa dreimal so stark umgesetzt wie BDHA2OMe **30e** mit einer Umsetzungsrate von $9.6 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP1A2}^{-1}$.

Tabelle 5-3 Vergleich der Umsetzungen der Referenzsubstrate zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Enzyme mit den Umsetzungen von BDHA2OMe durch die eingesetzten CYP450-Isoenzyme. Spez. Akt. = spezifische Aktivität in $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol P450}^{-1}$. Inkubationszeit A: durch den Hersteller angegeben; Inkubationszeit B: Zeit für maximale spezifische Aktivität; *Zeit für bessere Vergleichbarkeit.

Nummer	CYP450-Isoenzym	Substrat A, Reaktion, Inkubationszeit	Spez. Akt. A, (Inkubationszeit A)	Spez. Akt. B von BDHA2OMe (Inkubationszeit B)	Faktor B/A
1	1A2	Phenacetin-Deethylierung,	30 (10 min)	9.6 (15 min)	0.32
2	2A6	Coumarin-7-Hydroxylierung	11.1 (15 min)	2.3 (15 min)	0.21
3	2B6	7-Ethoxy-4-trifluor-methylcoumarin-Deethylierung	4.9 (15 min)	17.5 (15 min)	3.57
4	2C8	Paclitaxel-6 α -Hydroxylierung	5.4 (10 min)	1.9 (15 min)	0.35
5	2C9*1	Diclofenac-4'-Hydroxylierung	40 (10 min)	10.1 (15 min)	0.25
6	2C19	(S)-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung	3.4 (30 min)	5.9 (15 min)	1.74
7	2D6*1	(+/-)-Bufuralol-1'-Hydroxylierung	46 (10 min)	3.7 (30 min)*	1.08
8	3A4	Testosteron-6 β -Hydroxylierung	46 (10 min)	3.0 (15 min)	0.07
9	4F2	Leukotrien-B4- ω -Hydroxylierung	170 (10 min)	4.2 (15 min)	0.02
			2.9 (10 min)	0.03 (60 min)	0.01

Bei der Metabolisierung von **30e** durch die verschiedenen CYP450-Isoenzyme lieferte das Cytochrom P450-2C19 keine auffälligen Ergebnisse. Der Vergleich der Demethylierungsrate von Dimethoxy-Benzamidin **30e** ($5.9 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2C19}^{-1}$ nach 15 Minuten bzw. $3.7 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2C19}^{-1}$ nach 30 Minuten) mit der Hydroxylierungsrate des Referenzsubstrats von CYP2C19 ($3.4 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP2C19}^{-1}$ nach 30 Minuten) offenbarte allerdings eine gleiche bis zweifach

verstärkte Metabolisierung von **30e**. Für eine sinnvolle Auswertung der spezifischen Aktivitäten wurde hier zusätzlich der entsprechende Wert nach 30-minütiger Inkubation berechnet, wenngleich die Umsetzung innerhalb von 15 Minuten eine größere Stoffmenge Metabolit pro Zeit ergab (siehe Tabelle 5-3, Nummer 6). Folglich könnte BDHA2OMe **30e** auch für die Überprüfung der Aktivität von CYP2C19 als sinnvolles empfindlicheres Substrat eingesetzt werden.

Die Aktivierung von BDHA2OMe **30e** durch SLMs fiel niedrig bis durchschnittlich aus (siehe Abbildung 5-10). Eine sehr hohe Metabolisierung durch die porcinen Lebermikrosomen im Vergleich zu allen getesteten Isoenzymen hätte darauf hingedeutet, dass mindestens ein stark metabolisierendes CYP450-Isoenzym noch nicht getestet wurde.¹⁹⁶ Die relativ niedrigen Umsetzungsraten können mit dem geringen Vorkommen des die Demethoxylierung am stärksten katalysierenden Isoenzym CYP2B6 begründet werden.

Überraschend war das Resultat der Inkubationen von Dimethoxy-Benzamidin **30e** mit CYP4F2, da dieses Isoenzym als hauptsächliches oxidativ *O*-demethylierendes CYP450-Enzym für 2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan-bis-*O*-methyramidoxim (Pafuramidin **7**) beschrieben wurde und bei dem hier verwendeten Substrat **30e** die gleiche Reaktion zur Aktivierung nötig war. Es wurden jedoch keine Umsetzungen beobachtet. Die Wiederholung der Inkubationen unter Einsatz der doppelten CYP4F2-Enzymkonzentration lieferte keine veränderten Ergebnisse. Umsetzungsversuche mit einer neu bestellten Charge CYP4F2 erbrachten die gleichen Resultate. Da allerdings nicht nur die zu katalysierende Reaktion für die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen entscheidend ist, passt eventuell BDHA2OMe **30e** schlichtweg nicht in die Bindungstasche des aktiven Zentrums von CYP4F2. Die höchste berechenbare Umsetzungsrate von BDHA2OMe **30e** durch CYP4F2 betrug mit $0.03 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP4F2}^{-1}$ nach 60 Minuten gerade einmal 1 % verglichen mit der Hydroxylierung von Leukotrien-B4 ($2.9 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol CYP4F2}^{-1}$ nach 10 Minuten). Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten, welche für die Referenzverbindung zur Bestimmung der spezifischen Aktivität gewählt wurde, konnte kein Metabolit **14** oder **72** von BDHA2OMe **30e** detektiert werden. Der direkte Vergleich der spezifischen Aktivitäten nach den gleichen Inkubationszeiten würde folglich sogar eine Metabolisierung von **30e** von deutlich unter einem Prozent ergeben (siehe Tabelle 5-3, Nummer 9).

In Abbildung 5-11 ist die physiologische Bedeutung der einzelnen CYP450-Enzyme für die Aktivierung von BDHA2OMe **30e** durch oxidative *O*-Demethylierung zu erkennen. Die Daten wurden unter der Annahme berechnet, dass die absolute Stoffmenge an metabolisiertem Substrat **30e** direkt proportional zur Menge des Isoenzym (angegeben in % der Gesamt-CYP450-Menge)¹⁹⁷ und dessen spezifischer Aktivität für die Metabolisierung von BDHA2OMe **30e** sein musste.

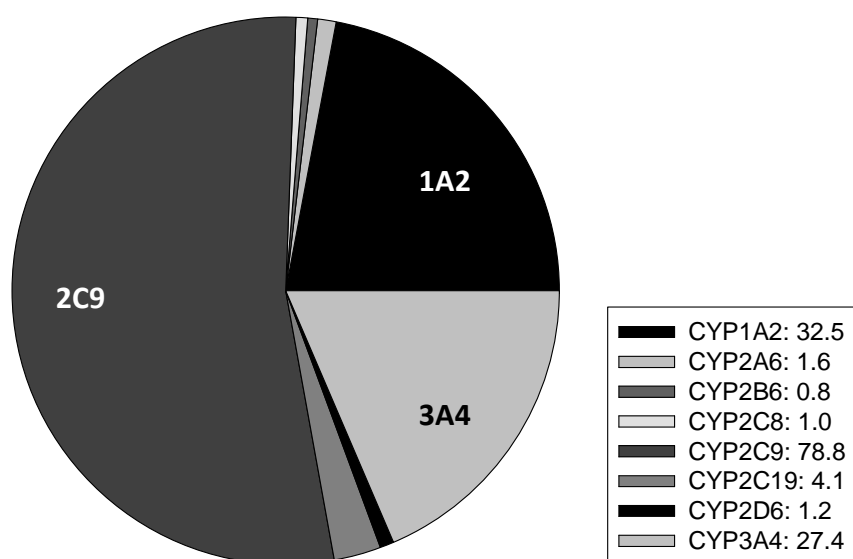


Abbildung 5-11 Darstellung der physiologischen Bedeutung der CYP450-Isoenzyme für die Aktivierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e**. Die angegebenen Werte resultierten aus dem prozentualen Anteil des Isoenzym¹⁹⁷ und der spezifischen Aktivität für die *O*-Demethylierung von BDHA2OMe **30e** in % \times pmol/(min \times pmol P450).

Als Resultat ist zu erkennen, dass CYP2B6, welches pro Stoffmenge Enzym am meisten Dimethoxy-Benzamidin **30e** umsetzen konnte, physiologisch möglicherweise keine so große Bedeutung für diese Katalyse besitzt (siehe Abbildung 5-11). Stattdessen würde der größte Anteil an aufgenommenen BDHA2OMe **30e** eindeutig durch CYP2C9 metabolisiert und zur Modell-Wirkform **15** aktiviert werden. Außerdem deutet diese Darstellung darauf hin, dass CYP3A4, das häufigste und bedeutendste arzneistoffmetabolisierende CYP450-Isoenzym der Leber, wahrscheinlich ebenfalls sehr wesentlich für die Demethylierung des Substrats **30e** sein könnte, was allein durch die Inkubationen nicht erkennbar war. Die Aktivierung eines Arzneistoffs durch CYP450-Enzyme zur Wirkform ist auch für andere Verbindungen bekannt. So werden beispielsweise Codein und Tramadol durch CYP2D6-abhängige *O*-Demethylierung in aktivere Metabolite überführt.^{198,199} Auch Losartan wird durch Cytochrom P450 durch Oxidation zu der aktiveren Carbonsäure umgesetzt. Das verantwortliche Isoenzym ist, wie bei der „Aktivierung“ von BDHA2OMe **30e**, CYP2C9.²⁰⁰

Die Kontrollen belegten, dass keine Metabolite detektierbar waren, wenn kein Substrat **30e** eingesetzt wurde. Bei den Inkubationen mit abgekochten Proteinen konnte eine leicht erhöhte Konzentration an BAOMe **72** detektiert werden, woraus geschlossen wurde, dass eine einfache *O*-Demethylierung in geringem Maße auch allein durch NADPH katalysiert werden konnte. Ohne das Cosubstrat NADPH und mit aktivem Protein entstanden keine nennenswerten Mengen an Metaboliten. Für die Metabolisierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e** war NADPH also essenziell.

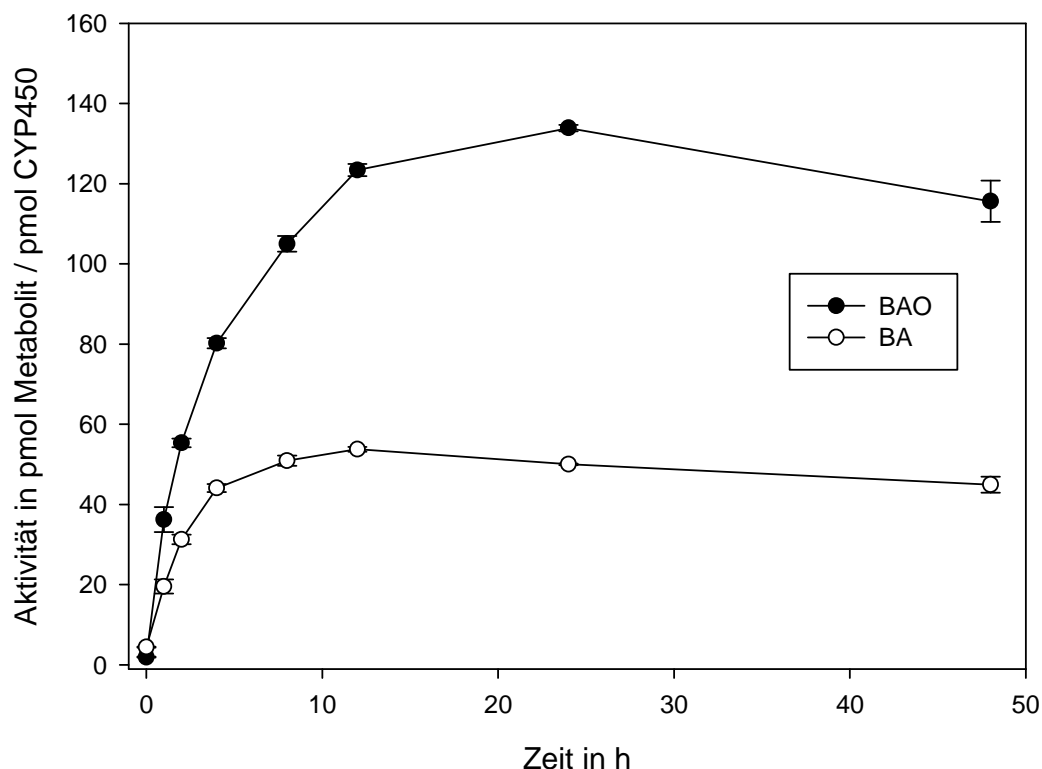


Abbildung 5-12 Bei der Inkubation von 1.5 mM BDHA2OMe 30e mit 0.1 mg/150 μ l SLMs über 48 Stunden entstand über 8 Stunden BAO 14. Wenig BA 15 bildete sich möglicherweise durch Verunreinigungen mit SLMt. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC-Analytik vermessen wurden.

Weitere Versuche zu den Reaktionsbedingungen ergaben, dass die dreifache Erhöhung der Menge an NADPH die Bildung der Metabolite BAOMe **72**, BAO **14** und BA **15** nicht steigerte. Der vielfach in der Literatur beschriebene nötige Zusatz an Magnesiumchlorid als Aktivator der Proteine stellte sich in vergleichenden Versuchen mit und ohne $MgCl_2$ als unnötig, aber nicht störend heraus.^{64,201} Inkubationsansätze über 8- bzw. 48 Stunden und deren Auswertung mit den dafür erstellten Wiederfindungen ergaben keine weitere Aktivität der eingesetzten Enzyme nach 8 Stunden (siehe Abbildung 5-12). Dies war wahrscheinlich auf die begrenzte Lebensdauer der CYP450-Enzyme unter künstlichen physiologischen Bedingungen zurückzuführen, da noch ausreichend Substrat vorhanden war. Der Abfall der Kurven zum Ende hin könnte mit der nur näherungsweise linearen Interpolation zwischen den 8- bzw. 48 h-Wiederfindungsfunktionen erklärt werden, für welche eine angenommene lineare Verdunstung an wässrigem Medium berechnet wurde. Die Bildung der absoluten Menge der Metabolite pro Zeit war stark abhängig von der eingesetzten Menge an Protein.

5.2.3.3 Bioaktivierung von 5,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol

Die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte von BDHA Ace **13d** waren 5,5-Dimethyl-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol **73**, *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**), Benzamidoxim (**14**) und Benzamidin (**15**) (siehe Abbildung 5-13). Da sich BDHA **9e** instabil in wässrigen Medien verhielt und nicht als detektierbares Abbauprodukt erwartet wurde, wurde keine Kalibrierung und Wiederfindung mit dieser Verbindung erstellt. BAO Ace **73** konnte als Metabolit ebenfalls nicht nachgewiesen werden, weswegen auf die Erstellung einer Wiederfindung dieser Verbindung **73** verzichtet wurde.

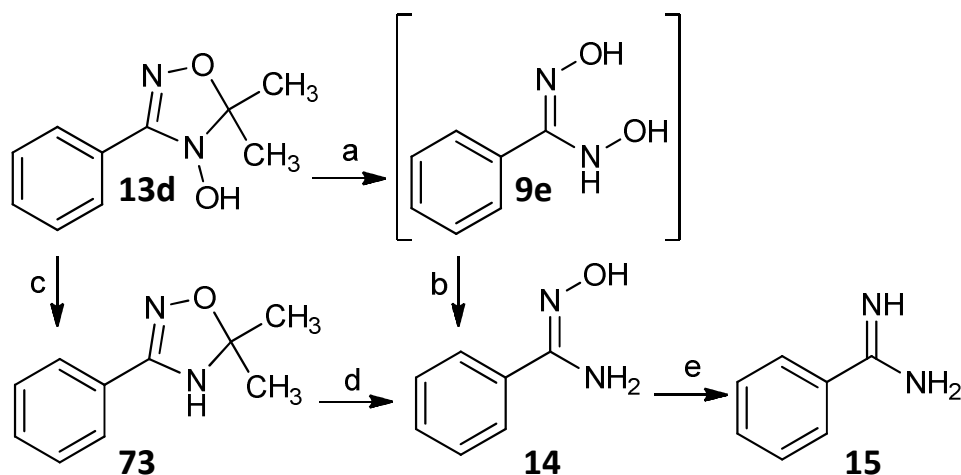


Abbildung 5-13 BDHAAce **13d** und die theoretisch möglichen Metabolisierungsprodukte Dihydroxybenzamidin **9e**, BAOAce **73**, Benzamidoxim (**14**) und Benzamidin (**15**). **a**, **c**, **d**, und **e** stellen mögliche enzymatische und nicht-enzymatische Umsetzungswege dar. **b**: nachgewiesener spontaner Zerfall.

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Kalibrierung von BA **15** und BAO **14** lagen bei $r^2 > 0.99$, die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Wiederfindung entsprachen ebenfalls $r^2 > 0.99$.

Die Bestimmungsgrenzen für BA **15** und BAO **14** lagen mit einer maximal zulässigen relativen Standardabweichung von 10 % bei 1 μM , die Nachweisgrenzen der Verbindungen entsprachen 0.5 μM .

Für Benzamidin (**15**) wurde eine Wiederfindungsrate von 120 % bestimmt und die Wiederfindungsrate von Benzamidoxim (**14**) wurde als 121 % ermittelt.

Die Stabilität von 5,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (**13d**) wurde durch die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen als gut bis sehr gut eingeschätzt (siehe Kapitel 3.3.4.1). Allerdings verhielt sich die Verbindung **13d** schon während der Synthesen als widersprüchlich im Hinblick auf die Beständigkeit. In einem Fall gelang die Reaktion und das Produkt **13d** schien stabil und bei einem nächsten Ansatz zersetzte sich die Verbindung **13d** plötzlich und ohne bewusste Änderung der Reaktionsbedingungen im Vergleich zum vorherigen Reaktionsansatz. Dieser Effekt schien auch bei den Inkubationen eine Rolle zu spielen, wie einige nicht erklärbare Chromatogramme der HPLC-Analytik vermuten ließen.

Neben BAO **14** und BA **15** wurde die Metabolisierung zu BAOAce **73** und BDHA **9e** untersucht, allerdings entstanden letztere Verbindungen nicht. Folglich schien die Desalkylierung von BAOAce **73** deutlich schneller zu verlaufen, als die Reduktion des Substrats BDHAAce **13d**, der Reaktionsschritt **c** schien also geschwindigkeitsbestimmend gegenüber dem Reaktionsschritt **d** der Abbildung 5-13 zu sein. Erwartet wurde, dass Reduktionen *N*-hydroxylierter Verbindungen schneller verlaufen würden, als Desalkylierungen, wie es in Kapitel 5.2.3.2 mit dem Substrat BDHA2OMe **30** gezeigt wurde. Aufgrund dessen konnte angenommen werden, dass der Reaktionsweg **a-b** gegenüber den Reaktionsschritten **c-d** bevorzugt ablief. Auf diese Weise waren die erhaltenen Ergebnisse und das Fehlen der Verbindung BAOAce **73** als eine Zwischenstufe erklärbar, da sich die Verbindung im Puffermedium als stabil erwies. Das Intermediat BDHA **9e** konnte aufgrund seiner Instabilität

(schnelle nichtenzymatische Reduktion) und der schnellen enzymatischen Reduktion wie auch bei der Inkubation des Substrats BDHA2OMe **30** nicht nachgewiesen werden.

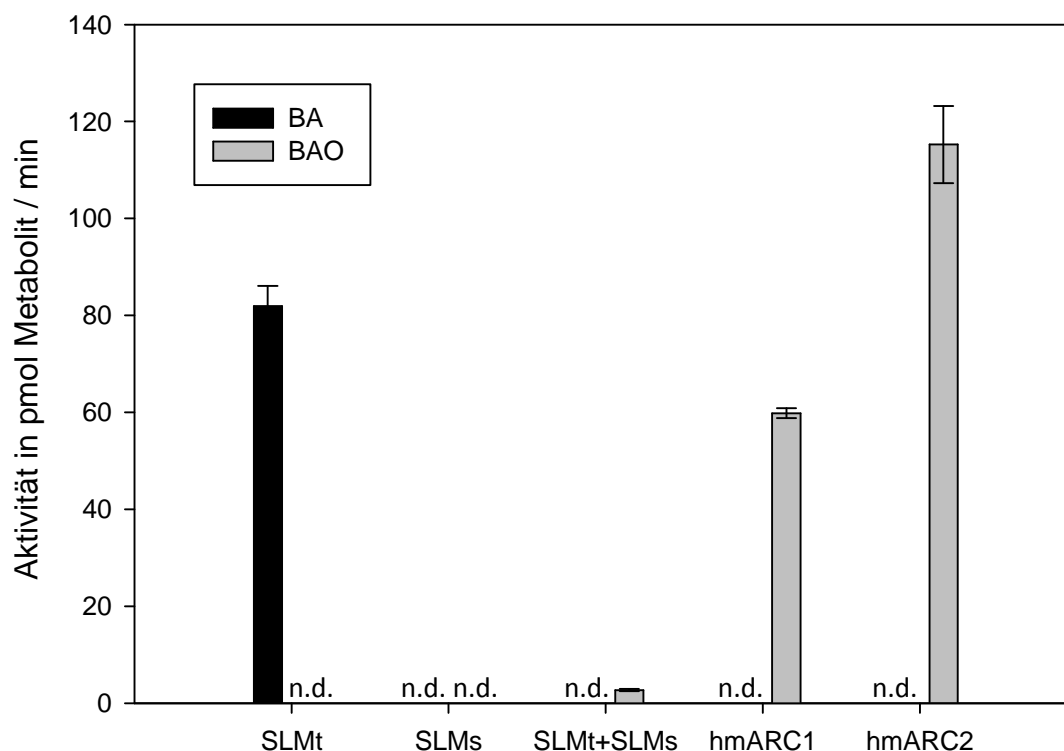


Abbildung 5-14 Metabolisierungsprodukte von BDHAAce **13d** durch unterschiedliche Zellfraktionen bzw. durch das rekonstituierte rekombinante hmARC-System. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden. n.d. = nicht detektiert.

Bei der Inkubation von BDHAAce **13d** mit Schweinelebermitochondrien konnte Benzamidin (**15**) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-14). Unklar war, wie die zwingende Zwischenstufe Benzamidoxim (**14**) in diesem Versuch entstand, da eine *O*- und *N*-Desalkylierung notwendig war. Erwartet wurde, dass diese Reaktionen durch das CYP450-Enzymsystem in den Mikrosomen katalysiert würden. Diese Proteine lagen in dem Inkubationsansatz allerdings nicht vor. Möglich war eine leichte Verunreinigung der mitochondrienhaltigen Zellfraktion mit SLMs, welche für die Desalkylierung verantwortlich war, und eine schnelle Reduktion der BAO **14**-Zwischenstufe. Allerdings hätte der Inkubationsansatz, welcher SLMt und SLMs enthielt schlussfolgernd dann mindestens gleich viel **15** liefern müssen. Weiterhin wurde bei dem Versuch mit SLMs BAO **14** erwartet, was die Fähigkeit der CYP450-Enzyme sowohl zur *O*- als auch zur *N*-Desalkylierung belegt hätte. Dies war aber nicht der Fall. Auch das nachgewiesene Benzamidoxim (**14**) durch die Inkubation des Substrats **13d** mit dem rekonstituierten rekombinanten mARC-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystem konnte mit den bisher erhaltenen Erkenntnissen nicht in Einklang gebracht werden, da bereits gezeigt wurde, dass mARC keine *O*-Desalkylierungen katalysieren kann (siehe Kapitel 5.2.3.2). Sollte mARC die cyclischen Verbindungen *O*- und *N*-desalkylieren können, hätte zumindest mARC-abhängig sofort Benzamidin (**15**) aus BAO **14** entstehen müssen. Da dies nicht durch die Versuche nachvollzogen werden konnte, war davon auszugehen, dass die nachgewiesenen Verbindungen BA **15** und BAO **14** nach den Inkubationen mit unterschiedlichen Proteinen hauptsächlich

nichtenzymatische Zersetzungsprodukte von BDHAAce **13d** darstellten. Zur Klärung der Rückschlüsse auf die Ergebnisse wäre eine mehrfache Wiederholung der Versuche sinnvoll.

5.2.4 Zusammenfassung

Bei den Umsetzungen von BDHA **9e** und BDHAAce **13d** mit CYP450-haltigen Mikrosomen konnte vor allem das nichtenzymatische Abbauprodukt BAO **14** detektiert werden. Zwar kann BAO **14** wahrscheinlich auch enzymatisch entstehen, jedoch sind die detektierten Mengen hauptsächlich auf die Instabilität der Substrate **9e** und **13d** im Wässrigen zurückzuführen. Der theoretische Metabolit des cyclischen Substrats **13d**, BAOAce **73**, wurde nicht gefunden. Durch den Einsatz von mARC-haltigen Mitochondrien konnte die rein enzymatische Entstehung des Modell-Wirkstoffs Benzamidin (**15**) nachgewiesen werden.

Dimethoxy-Benzamidin **30e** verhielt sich in den für die Inkubationen eingesetzten wässrigen Medien sehr stabil. Alle Abbauprodukte stellten also enzymatisch gebildete Metabolite dar. Das Substrat konnte durch Mikrosomen demethyliert werden. Allerdings entstand auch hier nicht die theoretische Zwischenstufe BAOMe **72**, sondern Benzamidoxim (**14**) als zweifach demethyliertes und einfach (nichtenzymatisch) reduziertes Produkt. Wurde zusätzlich mit Mitochondrien inkubiert, konnte das durch enzymatische *N*-Reduktion entstehende Endprodukt BA **15** nachgewiesen werden.

Die weiterführenden Untersuchungen befassten sich mit der CYP450-abhängigen Demethylierung von BDHA2OMe **30e**. Unter den getesteten Isoenzymen konnte die höchste Umsetzungsrate des Substrats **30e** durch CYP2B6 nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms für die BDHA2OMe **30e**-Demethylierung übersteigt die der 7-Ethoxy-4-trifluormethylcoumarin-Deethylierung als Referenzumsetzung zur Aktivitätsüberprüfung von CYP2B6 um mehr als das Dreifache. Auch CYP2C9 und -1A2 zeigten eine hohe Metabolisierung von **30e**. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen der verschiedenen CYP450-Isoenzyme im menschlichen Organismus besitzen CYP2C9 und -1A2 wahrscheinlich die größte physiologische Bedeutung für die Aktivierung des Modell-Prodrugs **30e**. Als Metabolisierungsprodukt konnte bei allen Untersuchungen mit CYP450-Isoenzymen nur BAO **14** detektiert werden.

5.3 *In vivo*-Untersuchungen der Bioaktivierung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin in Ratten

5.3.1 Einleitung

Zur Untersuchung der Bioaktivierung und der Pharmakokinetik einer Substanz reichen *in vitro* Studien oft nicht aus. Im konkreten Fall der Nutzung der Dimethoxy-Benzamidin-Struktur als potentiell Prodrug-Prinzip für Arzneistoffe kann aus den *in vitro* Untersuchungen keine Information über die Absorption, Verteilung und Elimination der Substanz im lebenden Organismus gewonnen werden. Der Metabolismus konnte bedingt *in vitro* simuliert werden, jedoch können nicht imitierbare Einflüsse zu stark veränderten Ergebnissen *in vivo* führen.

Die Stabilitätsuntersuchungen der neu synthetisierten Dihydroxybenzamidine ergaben, dass das einfachste *O,O'*-disubstituierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidin **30e** die beste Beständigkeit der untersuchten Derivate besitzt. Die *O*-Methyl-Substituenten kommen im Gegensatz zu anderen synthetisierten Gruppen wie *O*-Benzyl- und *O*-Tetrahydropyranyl-Reste als Prodrug-Prinzip in Frage

und könnten die physikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften einiger amidinhaltiger Arzneistoffe deutlich verbessern.

5.3.2 Zielsetzung

In einer Studie an Ratten sollte die Pharmakokinetik des Modell-Prodrugs *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) untersucht werden. Dafür wurde die Testverbindung **30e** den Tieren oral verabreicht. Durch Entnahme von Blutproben nach unterschiedlichen Zeitpunkten sollten Informationen über Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination der Verbindung **30e** gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen von BDHA2OMe **30e** und dessen Metabolite BAOMe **72**, BAO **14** und BA **15** in den Blutproben nach unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (siehe Abbildung 5-15).

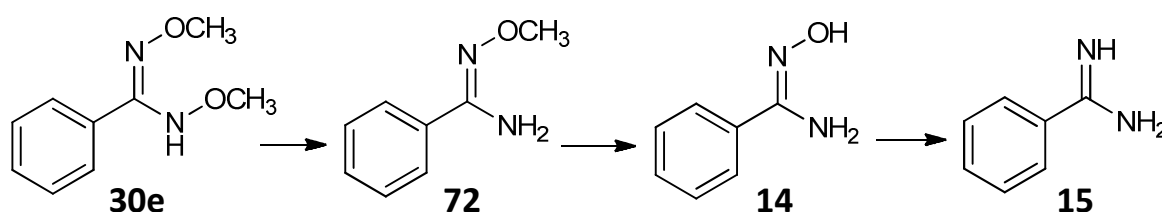


Abbildung 5-15 BDHA2OMe **30e** und dessen Metabolite BAOMe **72**, BAO **14** und die Modell-Wirkform BA **15**.

5.3.3 Studiendesign

Es wurden insgesamt 12 Ratten eingesetzt und in zwei Gruppen randomisiert. Sechs Ratten bekamen das Modell-Prodrug *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (KG) peroral als Lösung in Speiseöl (50 mg/ml) und sechs Ratten bekamen intravenös 5 mg/kg KG der Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) in Form einer Lösung in 0.9 % NaCl. Es wurden nach festgesetzten Zeitpunkten (siehe Kapitel 7.5.5.3) Blutproben entnommen und wie in Kapitel 7.5.5.4 beschrieben aufgearbeitet.

5.3.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Kalibrierung von BA **15**, BAO **14**, BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** lagen bei $r^2 > 0.9999$. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden der Wiederfindung entsprachen für BA **15** und BAOMe **72** $r^2 > 0.999$, für BAO **14** $r^2 > 0.9999$ und für BDHA2OMe **30e** $r^2 > 0.99$.

Die Bestimmungsgrenzen für BA **15**, BAO **14**, BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** lagen mit einer maximal zulässigen relativen Standardabweichung von 10 % bei 1 μ M, die Nachweisgrenzen der Verbindungen entsprachen 0.5 μ M.

Für Benzamidin (**15**) und *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) wurde eine Wiederfindungsrate von 96 % bestimmt, die Wiederfindungsrate von Benzamidoxim (**14**) lag bei 115 % und die von Dimethoxy-Benzamidin **30e** bei 75 %.

Nach Injektion von 5 mg/kg KG BA **15** in Form einer 29.1 mg/ml Benzamidinhydrochlorid-Monohydrat-Lösung **15** in 0.9 % NaCl wurden nach 5, 10, 20, 45, 90 und 180 Minuten etwa 300 μ l

Blutproben entnommen. Zusätzlich wurde den Ratten vor Injektion von Benzamidin (**15**) eine Blutprobe entnommen, um das Grundrauschen des reinen Plasmas in der HPLC bestimmen und für die Analyse der BA **15**-haltigen Proben berücksichtigen zu können. Die Aufarbeitung ergab die in Abbildung 5-16 dargestellten Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe.

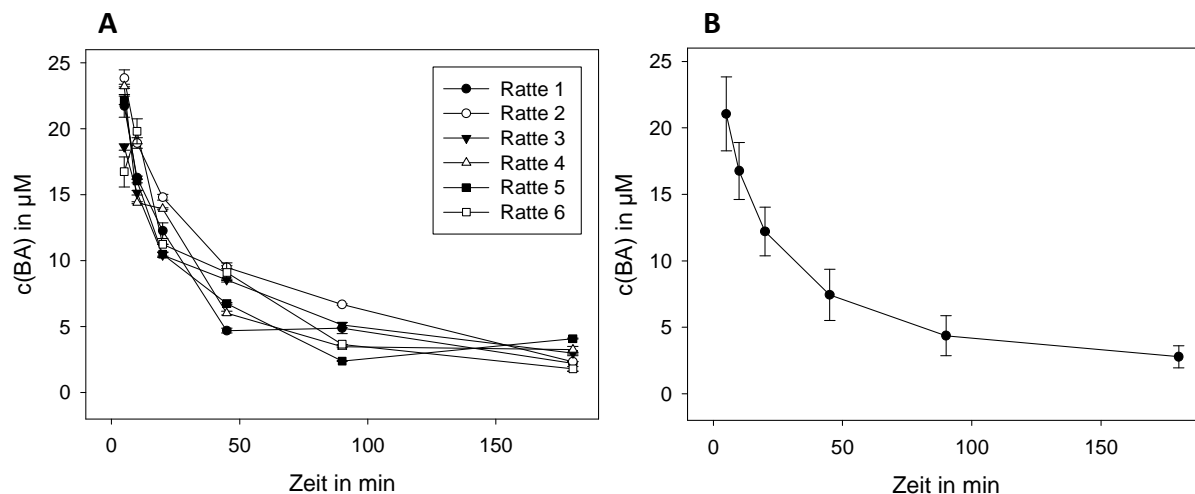


Abbildung 5-16 BA **15**-Konzentrationen im Rattenplasma nach intravenöser Bolusinjektion von 5 mg/kg KG Benzamidin (**15**). A: Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven aller Ratten; B: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve der MW \pm STABW.

Die BA **15**-Plasmakonzentration nimmt beginnend mit der ersten Probenentnahme nach fünf Minuten schnell ab und nähert sich der Konzentration von $0 \mu\text{M}$ nach drei Stunden an. Die Nachweisgrenze von Benzamidin (**15**) in Rattenplasma wurde nach drei Stunden allerdings noch nicht unterschritten, weswegen die Bestimmung der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC, *area under the curve*) als Maß für die aufgenommene Menge einer verabreichten Verbindung etwas ungenau war. Mit Hilfe des Excel-Zusatzprogramms PKSolver ließ sich die wahre AUC allerdings extrapolieren. Die Bioverfügbarkeit einer intravenös verabreichten Verbindung wurde definitionsgemäß 100 % gesetzt.²⁰²

Die detektierte Benzamidin (**15**)-Konzentration nach oraler Verabreichung von 5 mg/kg KG BDHA2OMe **30e** als Lösung in Speiseöl bei sechs verschiedenen Ratten unterlag sehr starken interindividuellen Schwankungen. Zwar lagen die meisten bestimmten Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze und waren folglich eindeutig dem Benzamidin (**15**) zuzuordnen, jedoch unterschieden sich die gefundenen BA **15**-Mengen stark von Ratte zu Ratte (siehe Abbildung 5-17, A). Da sich die gefundenen Konzentrationen der stark abweichenden Ratte 1 aber nach dem Student's t-Test mit $p > 0.05$ (0.08) nicht signifikant von den Plasma-BA **15**-Werten der Ratte 6 unterschieden, wurden sie mit in die Bildung der Mittelwerte einbezogen, was zu starken Standardabweichungen im Diagramm der Mittelwerte führte (siehe Abbildung 5-17, B). Der Durchschnittskurve B kann dennoch entnommen werden, dass **15** langsam aus BDHA2OMe **30e** im Rattenorganismus gebildet wurde. Da nach sechs Stunden noch kein signifikanter Abfall der BA **15**-Konzentration festgestellt werden konnte, war davon auszugehen, dass Benzamidin (**15**) noch über einen deutlich längeren Zeitraum gebildet wurde und einen konstanten Plasmaspiegel an der Modell-Wirkform **15** hervorrief.

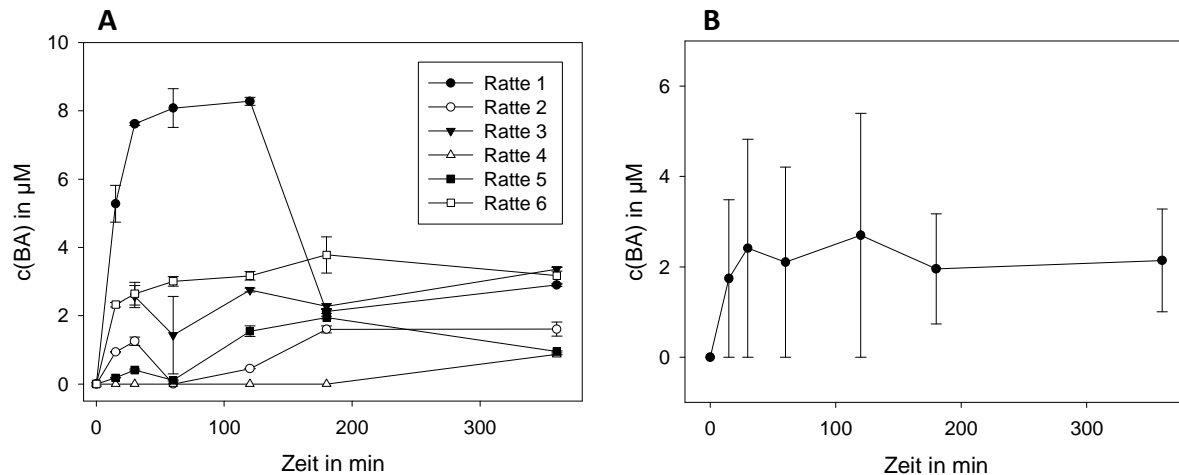


Abbildung 5-17 BA 15-Konzentrationen im Rattenplasma nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG BDHA2OMe 30e. A: Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven aller Ratten; B: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve der MW \pm STABW.

In Abbildung 5-18 ist zu erkennen, dass kaum Benzamidoxim (**14**) nach oraler Gabe von Dimethoxy-Benzamidin **30e** im Rattenplasma vorlag. Ratte 1, welche bis zu drei Stunden nach Applikation des BDHA2OMe **30e** auch erhöhte Benzamidin (**15**)-Konzentrationen zeigte, wies im Student's t-Test mit $p < 0.05$ (0.001) einen statistisch signifikanten Unterschied der Werte gegenüber den Mittelwerten und den ihr am nächsten kommenden Konzentrationen der Ratte 6 auf (siehe Abbildung 5-18, A). Aufgrund dessen wurde Ratte 1 für die Bildung der Mittelwerte ausgeschlossen (siehe Abbildung 5-18, B). Aus der Durchschnittskurve B wird deutlich, dass bis zu 30 Minuten nach oraler Gabe des Modell-Prodrugs **30e** BAO **14** als Metabolit in sehr niedrigen Konzentrationen vorlag. Zu späteren Zeitpunkten war keine nennenswerte Menge an Benzamidoxim (**14**) mehr detektierbar, was auf eine rasche Umwandlung zu BA **15** schließen ließ.

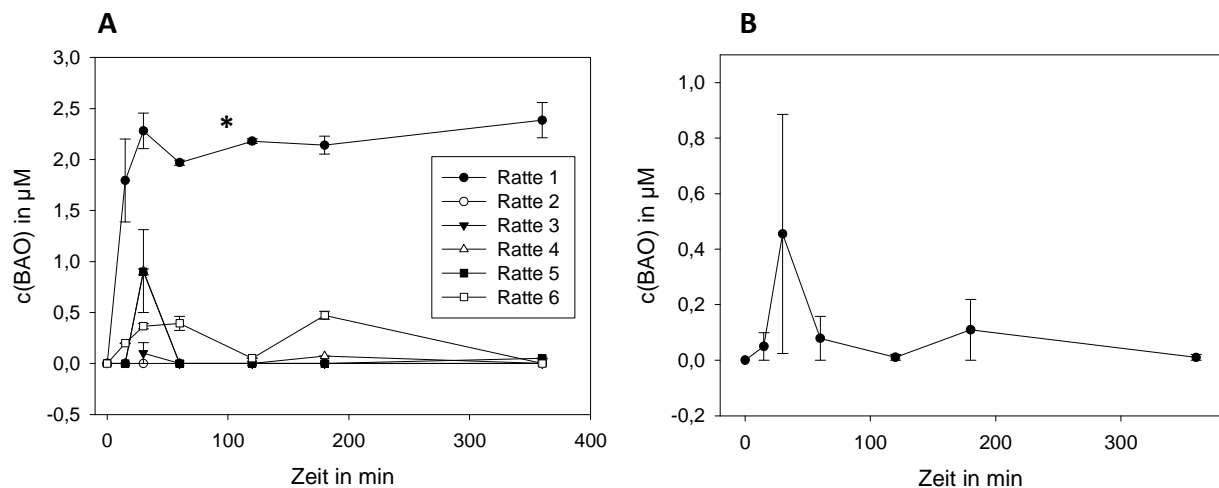


Abbildung 5-18 BAO 14-Konzentrationen im Rattenplasma nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG BDHA2OMe 30e. A: Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven aller Ratten; B: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve der MW \pm STABW ohne Ratte 1; *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven der Ratten 2-6 (Student's t-Test, $p < 0.05$).

O-Methylbenzamidoxim (**72**) war nach oraler Applikation von Dimethoxy-Benzamidin **30e** im gesamten Verlauf der Probenzüge über sechs Stunden bei jeder Ratte nachweisbar (siehe Abbildung 5-19, A). Die Konzentrationen des detektierten BAOMe **72** übersteigen dabei die gemessenen Konzentrationen für Benzamidoxim (**14**) und sogar Benzamidin (**15**). Nach einem Anstieg der

O-Methylbenzamidoxim (**72**)-Konzentration im Rattenplasma bis zu 30 Minuten nach oraler Gabe des Modell-Prodrugs **30e** pendelte sich der einfach demethoxylierte Metabolit **72** bei einer gleichbleibenden Konzentration von 5-6 μM ein. Anhand des Diagramms B der Abbildung 5-19 wurde kein rapider Abfall der BAOMe **72**-Konzentration nach sechs Stunden erwartet. Durch das Vorliegen von *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) in relativ hohen Konzentrationen verglichen mit den weiteren Metaboliten von BDHA2OMe **30e**, BA **15** und BAO **14**, musste davon ausgegangen werden, dass die Demethylierung von BAOMe **72** relativ langsam verlief und einen geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt darstellt.

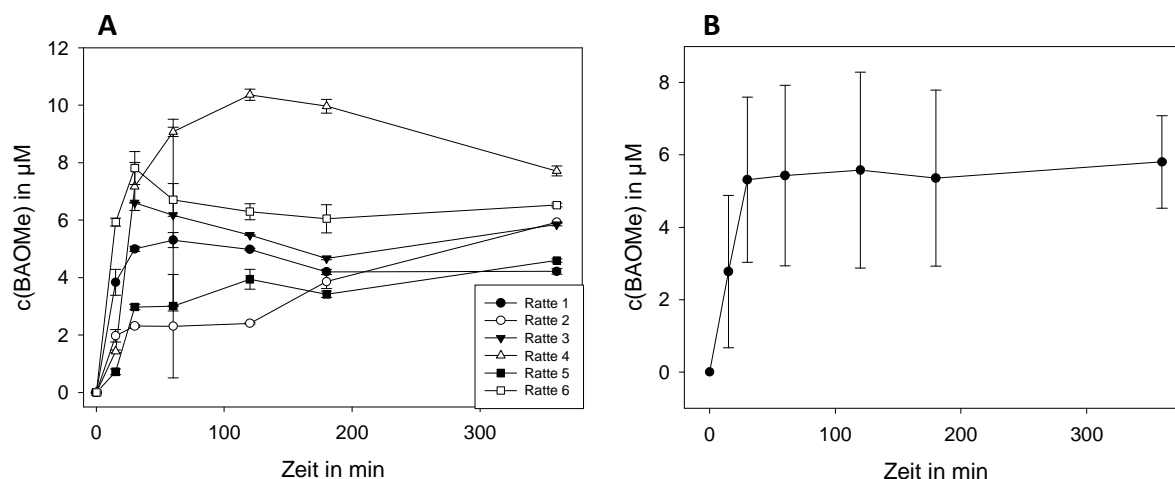


Abbildung 5-19 BAOMe **72**-Konzentrationen im Rattenplasma nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG BDHA2OMe **30e**. A: Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven aller Ratten; B: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve der MW \pm STABW.

Anhand der Einteilung der Skala für die Konzentration in Abbildung 5-20 wird sofort deutlich, dass Dimethoxy-Benzamidin **30e** in sehr hohen Konzentrationen im Rattenplasma wiedergefunden wurde. Bis zu etwa 30 Minuten nach oraler Gabe stieg die Konzentration des Modell-Prodrugs **30e** im Plasma an. Die maximale Plasmakonzentration an BDHA2OMe **30e** wurde zwischen 15 und 60 Minuten erreicht, anschließend fiel die detektierbare Substratmenge **30e** langsam ab. Die einzelnen Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Ratten 1-6 unterschieden sich nach Student's t-Test nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 5-20, A). Auch nach sechs Stunden waren hohe Konzentrationen der Verbindung **30e** im Rattenplasma nachweisbar (siehe Abbildung 5-20, B). Ein rapider Abfall der Konzentration nach sechs Stunden war auch bei dem eingesetzten Substrat **30e** durch den Verlauf der Kurve nicht zu erwarten. Da über einen sehr langen Zeitraum viel BDHA2OMe **30e** nachweisbar war und offensichtlich keine schnelle Eliminierung stattfand, konnte davon ausgegangen werden, dass die erste Demethoxylierungsreaktion durch den Metabolismus einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellte. Die CYP450-abhängige Reaktion war also scheinbar entscheidend für die Aktivierung des Modell-Prodrugs **30e** zur Modell-Wirkform Benzamidin (**15**).

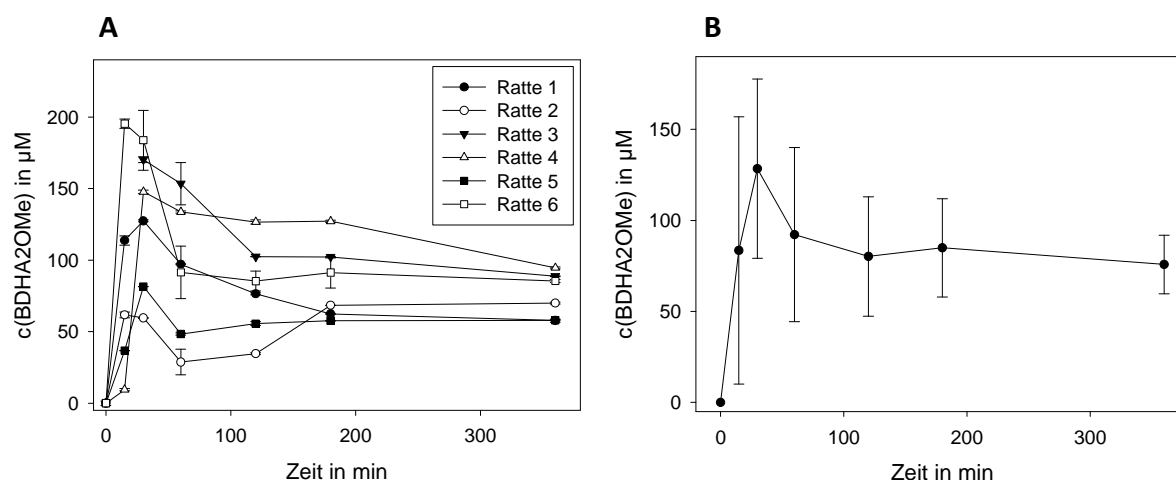


Abbildung 5-20 BDHA2OMe 30e -Konzentrationen im Rattenplasma nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG BDHA2OMe 30e. A: Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven aller Ratten; B: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve der MW \pm STABW.

Insgesamt wurde durch den *in vivo*-Versuch deutlich, dass die Aktivierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e** zur Wirkform Benzamidin (**15**) stark von der Geschwindigkeit der CYP450-abhängigen Demethylierung sowohl von BDHA2OMe **30e** als auch von BAOMe **72** abhing ist. Da diese Reaktionen langsam verliefen, waren die Substrate BDHA2OMe **30e** und BAOMe **72** in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (siehe Abbildung 5-21). Die mARC-abhängige Reduktion zum BA **15** verlief sehr schnell, sodass die metabolische Zwischenstufe BAO **14** kaum nachweisbar war (siehe Abbildung 5-21, B). Die langsame Aktivierung des Dimethoxy-Prodrugs **30e** könnte allerdings auch den Vorteil haben, dass ein arzneiformunabhängiger Retard-Effekt erreicht werden könnte. Wie lange die Konzentration der Modell-Wirkform BA **15** nach den bisher getesteten sechs Stunden konstant bleibt, müsste durch weitere Untersuchungen festgestellt werden. Die Abhängigkeit der Bioaktivierung von den CYP450-Enzymen kann durch mögliche Interaktionen mit der Metabolisierung anderer körpereigener und körperfremder Verbindungen als problematisch eingestuft werden, jedoch ergaben die Inkubationen mit zahlreichen pharmakologisch relevanten CYP450-Isoenzymen, dass BDHA2OMe **30e** durch eine Reihe von Isoenzymen aktiviert werden kann. Ein absoluter Ausfall der Aktivierung aufgrund von Interaktionen mit anderen Arzneistoffen wird also nicht erwartet. Allerdings könnte die Metabolisierungsrate signifikanten interindividuellen Schwankungen unterliegen, da das physiologisch bedeutsamste BDHA2OMe **30e**-aktivierende Isoenzym CYP2C9 einem Polymorphismus unterliegt und daher in stark variierender Häufigkeit bei Menschen vorkommt.

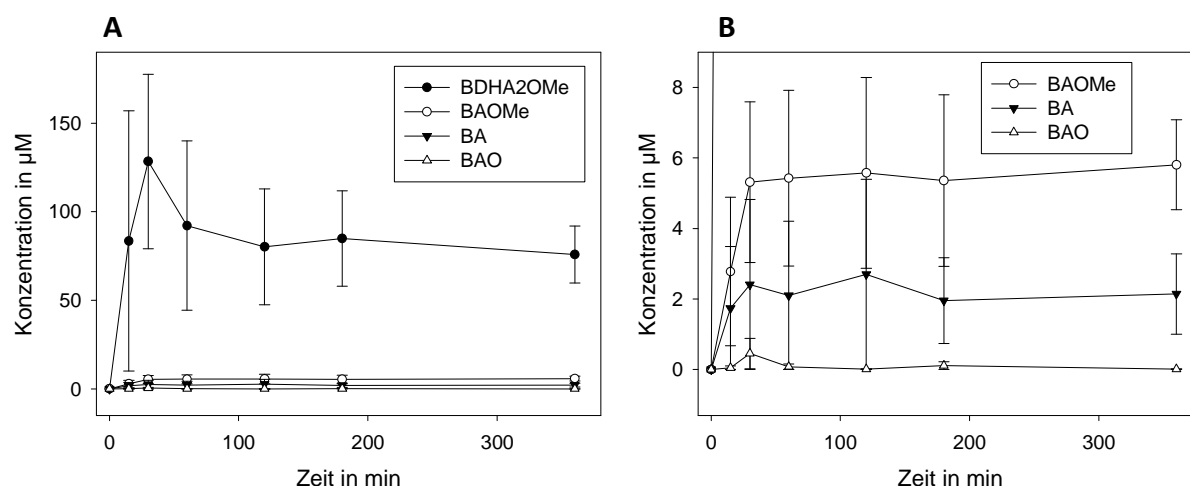


Abbildung 5-21 Vergleich der Mittelwerte der im Rattenplasma von sechs Ratten gefundenen Konzentrationen an BA 15, BAO 14, BAOMe 72 und BDHA2OMe 30e mit Standardabweichungen nach oraler Applikation von BDHA2OMe 30e. A: Im Vergleich zu BDHA2OMe 30e ist die Konzentration der Metabolite verschwindend klein; B: Vergleich der drei Metabolite untereinander.

Die Bioverfügbarkeit von Benzamidin (**15**) nach oraler Applikation von BDHA2OMe **30e** konnte mit Hilfe der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUCs) von **15** nach oraler Gabe von Dimethoxy-Benzamidin **30e** bezogen auf die der i.v.-Applikation von BA **15** bestimmt werden (siehe Formel 6). Die jeweiligen AUCs wurden trapezoidal mit dem Excel-Programm PKSolver berechnet. Die i.v.-Dosis an Benzamidin (**15**) betrug $41.67 \mu\text{mol/kg KG}$ und die orale Dosis an BDHA2OMe **30e** betrug $277.8 \mu\text{mol/kg KG}$.

Formel 6 Allgemeine Formel zur Berechnung der Bioverfügbarkeit.

$$\text{Bioverfügbarkeit}(\%) = \frac{\left(\text{Dosis i.v. in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{kg KG}} \right) \times (\text{AUC oral in } \mu\text{M} \times \text{min}) \times 100 \%}{\left(\text{Dosis oral in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{kg KG}} \right) \times (\text{AUC i.v. in } \mu\text{M} \times \text{min})}$$

In Tabelle 5-4 sind die berechneten AUCs aller Metabolite für die Zeit der Probenentnahme aufgeführt (Nummer 1, 3, 5, 6 und 7). Diese Werte sind für BA **15**, BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** (Nummer 1, 3, 6 und 7) stark abweichend von den erwarteten Werten bis zu den Zeitpunkten, an denen die Metabolite nicht mehr im Plasma nachweisbar waren. Die Berechnung der Bioverfügbarkeit von BA **15** nach oraler Gabe von BDHA2OMe **30e** ergab folglich unrealistische Ergebnisse bei Verwendung der „unvollständigen“ AUCs (Nummer 3, Tabelle 5-4). Da die Konzentrationen von annähernd Null zum Versuchsendpunkt noch nicht erreicht waren, spielen auch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Beendigungen der Versuche, 180 Minuten bei i.v.-Applikation von BA **15** und 360 Minuten bei der oralen Gabe von BDHA2OMe **30e**, eine Rolle und führen zu einer Verfälschung des Ergebnisses zugunsten der oralen Bioverfügbarkeit von BA **15** (Nummer 3, Tabelle 5-4). Aufgrund dessen wurden durch Simulation der Kurvenverläufe bis zum Schnittpunkt mit der x-Achse zusätzlich extrapolierte AUCs bestimmt und der Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit von BA **15** zugrunde gelegt (Nummer 4, Tabelle 5-4).

Tabelle 5-4 Berechnete Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) des i.v. applizierten Benzamidins (**15**) und der oral verabreichten Verbindung BDHA2OMe **30e** sowie dessen nachgewiesene Metabolite BA **15**, BAO **14** und BAOMe **72**. *Die AUCs wurden durch das Programm PKSolver extrapoliert, da zum Endpunkt des Versuches noch Metabolite nachweisbar waren.

	applizierte Verbindung	Applikations-art	Verbindung/ Metabolit	AUC in $\mu\text{M} \times \text{min}$	Bioverfügbar- keit in %
1	Benzamidin (15)	i.v.	BA 15 (180 min)	1191	100 %
2*			BA 15*	1590	100 %
3	<i>O,O'</i> -Dimethyl-	oral	BA 15 (360 min)	784	9.9 % \pm 7.0 %
4*	<i>N,N'</i> -dihydroxy-		BA 15*	4192	39.5 % \pm 27.8 %
5	benzamidin (30e)		BAO 14	153	-
6			BAOMe 72	1906	-
7			BDHA2OMe 30e	30110	-

Die orale Bioverfügbarkeit von BA **15** nach Applikation des Modell-Prodrugs Dimethoxy-Benzamidin **30e** konnte annähernd realistisch mit den extrapolierten AUCs berechnet werden und lag bei etwa 40 % (Nummer 4, Tabelle 5-4). Weil nach oraler Gabe der Wirkform **15** selbst durch die bekanntlich fehlende Resorption geladener Moleküle eine Bioverfügbarkeit von annähernd 0 % erwartet wurde, stellte die Dimethoxylierung von Benzamidin-Strukturen ein geeignetes Prodrug-Prinzip zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit dar. Die große Standardabweichung war auf die geringe Anzahl getesteter Ratten zurückzuführen.

5.3.5 Plasmaproteinbindung

5.3.5.1 Einleitung

Nach Resorption einer Substanz durch den Organismus wird sie im Körper entsprechend des Blutflusses verteilt. In stark durchbluteten Geweben wird also eine höhere Konzentration an der resorbierten Verbindung erreicht.²⁰³ Dieser Verteilungsprozess ist gestört, wenn die Verbindung sich in bestimmten Kompartimenten oder Geweben anreichert. Dies kann aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften durch ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen geschehen. Während für körpereigene Stoffe oft spezielle Transporter zur Verfügung stehen, binden körperfremde Substanzen überwiegend an Serumalbumin.^{204,205} An Plasmaproteine gebundene Stoffe können sich nicht verteilen, keinen pharmakodynamischen Effekt auslösen, nicht biotransformiert werden und nicht eliminiert werden. Meist ist die Bindung an Plasmaproteine reversibel. Die gebundene und die freie Form stehen dabei in einem Gleichgewicht, dessen Lage vor allem von den physikochemischen Eigenschaften der Substanz abhängig ist. Dabei wirkt der an Plasmaproteine gebundene Anteil wie ein Depot für die Substanz, welche entsprechend des Gleichgewichts nach und nach aus der Plasmaproteinbindung freigesetzt wird. Die Plasmaproteinbindung lipophiler Verbindungen ist besonders hoch.²⁰⁴ Durch den der Elimination entzogenen proteingebundenen Anteil kann die Halbwertszeit der betreffenden Substanzen sehr hoch sein.²⁰⁶

5.3.5.2 Zielsetzung

Die im Rahmen der *in vivo*-Studie untersuchten Metabolite von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) – BAO **14**, BA **15** und BAOMe **72** und das Substrat **30e** selbst – sollten hinsichtlich ihrer Plasmaproteinbindung an Rattenplasmaproteine untersucht werden.

Zusätzlich sollten entsprechende Untersuchungen mit humanem Plasma durchgeführt werden, um die erhaltenen Daten der *in vivo*-Studie an Ratten besser auf die Bedingungen im Menschen übertragen zu können.

5.3.5.3 Ergebnisse und Diskussion

Jede zu untersuchende Verbindung wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen (5, 20 und 50 μM) in Sörensen-Phosphatpuffer, Rattenplasma und humanem Plasma gelöst und geschüttelt. Nach Überführung in Ultrafiltrationseinheiten wurden die Ansätze 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend 40 Minuten lang ultrafiltriert. Der Durchgang wurde der HPLC zugeführt (siehe Abbildung 5-22). Zusätzlich wurden die gleichen Lösungen in Sörensen-Phosphatpuffer ohne Ultrafiltration hergestellt und vermessen, um zu ermitteln, ob und wieviel Substanz im Filter verloren geht.

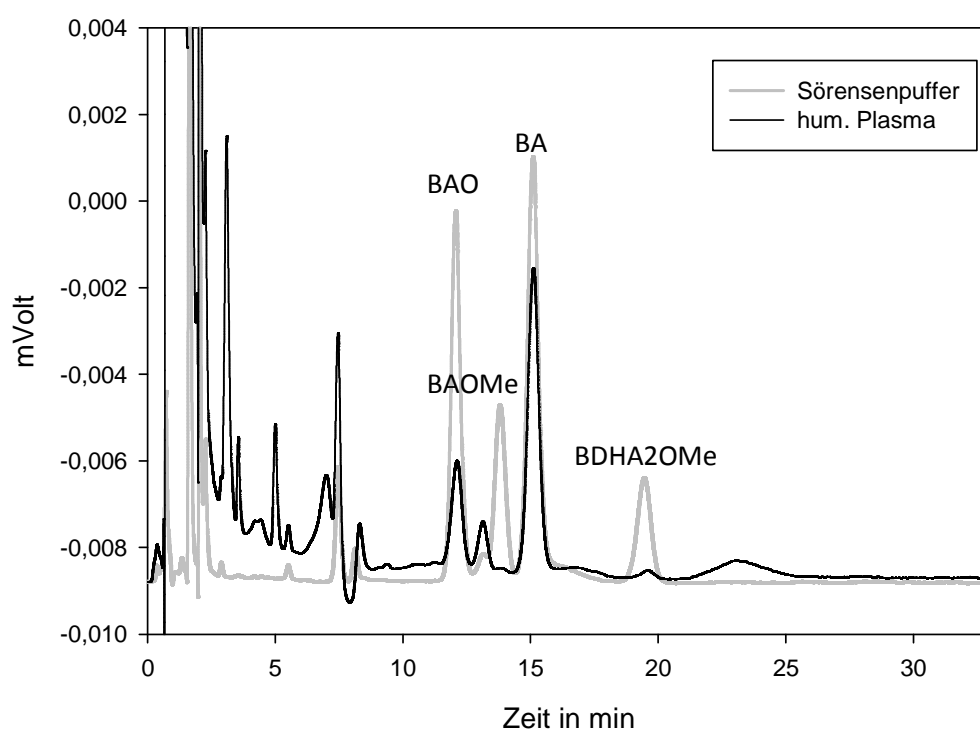


Abbildung 5-22 Repräsentative Chromatogramme der Flüssigchromatographie von jeweils 50 μl der Verbindungen BA **15**, BAO **14**, BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** in Sörensen-Phosphatpuffer nach Ultrafiltration (Sörensenpuffer) und in humanem Plasma nach Ultrafiltration (hum. Plasma).

Zwei überlagerte beispielhafte HPLC-Chromatogramme sind in Abbildung 5-22 dargestellt. In grau erkennt man die vier Derivate BA **15**, BAO **14**, BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** nebeneinander in Sörensen-Phosphatpuffer und anschließender Ultrafiltration. Im Vergleich dazu sind die gleichen Konzentrationen mit gleicher Behandlung in humanem Plasma als schwarze Linie erkennbar. Hier

wird deutlich, dass *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) und Dimethoxy-Benzamidin **30e** kaum im Plasma wiedergefunden werden konnten, folglich proteingebunden vorlagen und durch die Ultrafiltration zusammen mit den Proteinen entfernt wurden. Die Peaks, welche im humanen Plasma, nicht aber in der Probe Sörensenpuffer zu sehen sind, befanden sich auch in einer Vergleichsprobe, welche reines humanes Plasma enthielt und ebenfalls ultrafiltriert wurde und sind somit auf natürliche Plasmabestandteile zurückzuführen. Dazu gehörten etwa der deutliche Peak zwischen BAO **14** und BAOMe **72** und der breite Peak bei 24 Minuten.

Der nach Ultrafiltration wiedergefundene Anteil der Verbindung wurde durch Berechnung des Verhältnisses aus der Konzentration der Verbindung im Sörensen-Phosphatpuffer mit Ultrafiltration ($c(\text{Puffer} + \text{Filtration})$) und der Konzentration der Verbindung im Sörensen-Phosphatpuffer ohne Ultrafiltration ($c(\text{Puffer})$) berechnet (siehe Formel 7). Der im Filter verbliebene Anteil kalkulierte sich aus der entsprechenden Differenz zu 100 % (siehe Formel 8). Die Berechnung dieser Größe besitzt Bedeutung, da die Kalibrierung der Verbindungen ohne Ultrafiltration durchgeführt wurde. Wird im Plasma nach Ultrafiltration wenig Substanz wiedergefunden, kann abgeschätzt werden, ob und wieviel Substanz durch Adsorption an den Filter nicht im Durchgang nachweisbar war (siehe Formel 7).

Formel 7 Berechnung des Filterdurchgangs aus den Versuchen zur Plasmaproteinbindung.

$$\text{Filterdurchgang (\%)} = \frac{c(\text{Puffer} + \text{Filtration}) \times 100 \%}{c(\text{Puffer})}$$

Formel 8 Berechnung des am Filter verbliebenen Anteils einer Verbindung nach Ultrafiltration.

$$\text{Filteradsorption (\%)} = 100 \% - \text{Filterdurchgang (\%)}$$

Der freie Anteil einer Verbindung wird aus dem Verhältnis zwischen der wiedergefundenen Konzentration einer Verbindung im Plasma nach Ultrafiltration ($c(\text{Plasma})$) und der entsprechenden Verbindung im Sörensen-Phosphatpuffer nach Ultrafiltration ($c(\text{Puffer} + \text{Filtration})$) bestimmt (siehe Formel 9). Die Plasmaproteinbindung ergibt sich aus der Differenz des so berechneten Wertes zu 100 % (siehe Formel 10).

Formel 9 Berechnung des freien Anteils einer Verbindung im Plasma aus den Versuchen zur Plasmaproteinbindung.

$$\text{freier Anteil (\%)} = \frac{c(\text{Plasma}) \times 100 \%}{c(\text{Puffer} + \text{Filtration})}$$

Formel 10 Berechnung der Plasmaproteinbindung einer Verbindung.

$$\text{Plasmaproteinbindung (\%)} = 100 \% - \text{freier Anteil (\%)}$$

In der Abbildung 5-23 sind die wiedergefundenen Benzamidin (**15**)-Konzentrationen einer 5 µM-, 20 µM- und 50 µM-Lösung der Verbindung **15** in Sörensen-Phosphatpuffer nach und ohne Ultrafiltration sowie in Rattenplasma und humanem Plasma nach Ultrafiltration dargestellt. Es ist erkennbar, dass im Plasma generell weniger BA **15** wiedergefunden werden konnte im Vergleich zu den Ansätzen im Puffer. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Adsorption der Verbindung an den Filter der Ultrafiltrationseinheit war nicht zu erwarten, da die wiedergefundenen Konzentrationen im Puffer nach Ultrafiltration nicht niedriger waren als ohne diese. In der Konzentration von 50 µM

wurde sogar ein statistisch nicht signifikanter ($p > 0.05$) gegenteiliger Effekt bestimmt, was aber auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sein musste. Es wurde im Mittel 0.3 % des eingesetzten Benzamidins (**15**) an den Filter gebunden, es konnten also 99.7 ± 9.7 % wiedergefunden werden. Der freie Anteil im Rattenplasma betrug im Vergleich zur Referenz in Puffer nach Ultrafiltration im Mittel 92.5 ± 10.1 % des Benzamidins (**15**). Im humanen Plasma lagen 78.2 ± 1.1 % des BA **15** weiterhin frei vor. Die statistisch nicht signifikante Plasmaproteinbindung im Rattenplasma lag folglich bei 7.5 %. In humanem Plasma banden sogar statistisch nicht signifikante 21.8 % des Benzamidins (**15**) an Plasmaproteine. Der Unterschied der humanen und murinen Plasmaproteinbindung errechnete sich für die 20 μM -Konzentrationen nach dem Student's t-Test als statistisch signifikant. Generell wurde aber deutlich, dass der Großteil des BA **15** frei im Plasma vorlag und nicht an Proteine gebunden wurde. Dies war auch zu erwarten, denn **15** besitzt durch seine stark basische funktionelle Gruppe unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung und ist somit sehr hydrophil. Die überwiegend hydrophoben Wechselwirkungen mit Proteinen sollten also weniger ausgeprägt auftreten. Eine von Reeh [2008] bereits mit Benzamidin (**15**) durchgeführte Untersuchung kam zu einem ähnlichen Ergebnis mit einer Proteinbindung an Rinderserumalbumin von 12 % und einer Proteinbindung in porcinem Plasma von 24 %.⁹¹

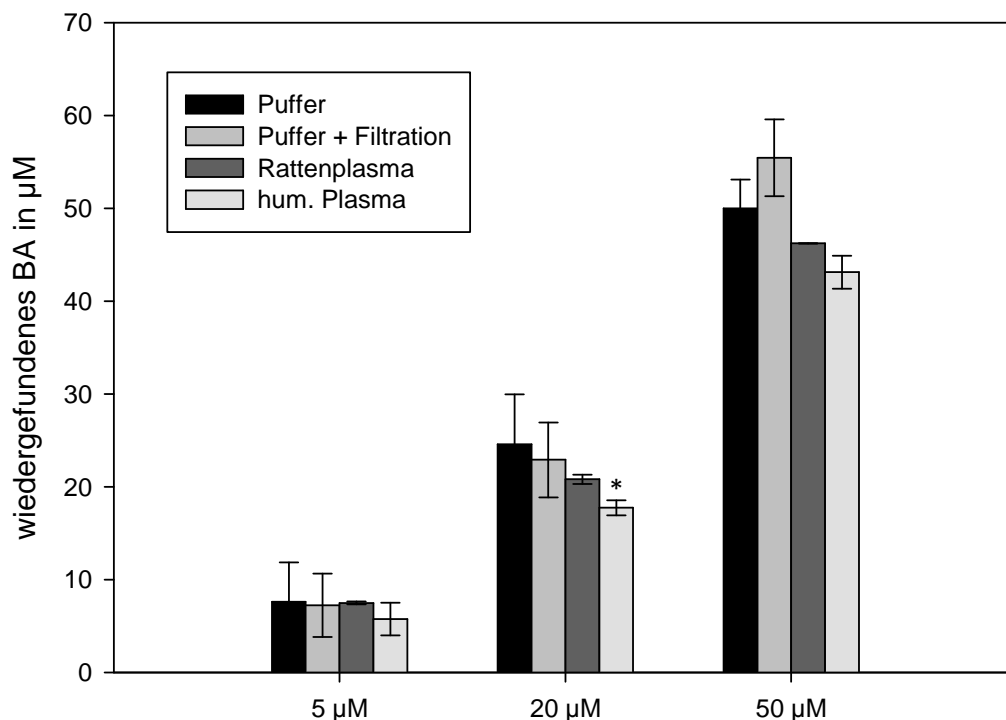


Abbildung 5-23 Wiedergefundene Konzentration an Benzamidin (**15**) in Sörensen-Phosphatpuffer (Puffer), in Sörensen-Phosphatpuffer nach Ultrafiltration (Puffer + Filtration), in Rattenplasma mit Ultrafiltration (Rattenplasma) und in humanem Plasma nach Ultrafiltration (hum. Plasma). Gezeigt sind die MW \pm STABW aus zwei Vermessungen mittels HPLC. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Rattenplasma (Student's t-Test, $p < 0.05$).

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Plasmaproteinbindung von Benzamidoxim (**14**) sind in Abbildung 5-24 dargestellt. Nach der Ultrafiltration konnte ein Anteil von durchschnittlich 81.2 ± 8.2 % BAO **14** im Sörensen-Phosphatpuffer wiedergefunden werden. Diese Konzentrationsverminderung um 18.8 % durch das Verbleiben von Substanz am Filter besaß für die

beiden kleineren Konzentrationen statistische Signifikanz. Deutlicher aber war die statistisch signifikante Verminderung der wiedergefundenen Konzentrationen des Benzamidoxims (**14**) in Rattenplasma und humanem Plasma bei allen eingesetzten Konzentrationen. Dabei wurde im humanen Plasma im Vergleich zum Rattenplasma weniger Substanz gefunden, was auf eine erhöhte Plasmaproteinbindung im humanen Plasma schließen ließ. Der im Rattenplasma nach Ultrafiltration im Vergleich zum Sörensen-Phosphatpuffer und gleicher Behandlung wiedergefundene Anteil an BAO **14** betrug im Mittel $34.9 \pm 24.8 \%$. Die Plasmaproteinbindung an Rattenplasma wurde also mit 65.1% bestimmt. Im humanen Plasma nach Ultrafiltration wurden $21.2 \pm 5.6 \%$ Benzamidoxim (**14**) nach Ultrafiltration bezogen auf die gleiche Behandlung der Proben mit Sörensen-Phosphatpuffer wiedergefunden, was eine höhere Plasmaproteinbindung in humanem Plasma von 78.8% bedeutete. BAO **14** wurde folglich in deutlich höherem Ausmaß an Plasmaproteine gebunden als BA **15**. Durch die erhöhte Lipophilie bedingt durch den Elektronenzug der Hydroxylgruppe, welche die Prodrug-Eigenschaften der Verbindung **14** ausmachen, war dieses Ergebnis auch zu erwarten. Dennoch wurde nicht angenommen, dass sich die Ergebnisse in Rattenplasma stark von denen in humanem Plasma unterscheiden würden, was offensichtlich aber der Fall war (siehe Abbildung 5-24). Für die $50 \mu\text{M}$ -Konzentrationen wurde ein signifikanter Unterschied der Plasmaproteinbindung in humanem Plasma und Rattenplasma nach Student's t-Test bestimmt. Reeh führte 2008 eine vergleichbare Untersuchung durch, indem anstelle von Plasma Rinderserumalbumin eingesetzt wurde. Dabei wurde eine deutlich geringere Proteinbindung von etwa 30% ermittelt.⁹¹ Die Abweichungen können durch die Unterschiede der eingesetzten Proteine bedingt sein, da sich Ratten- und humanes Plasma in der Zusammensetzung von Rinderserumalbumin unterscheiden. Andererseits bestehen Plasmaproteine zum Großteil aus Albumin, was hauptverantwortlich für die Bindung von Fremdstoffen ist, weswegen eine starke Abweichung nicht unbedingt zu erwarten war.²⁰⁷ Auch die Verwendung unterschiedlicher Ultrafiltrationseinheiten konnte der Grund für die Abweichung sein, worauf der stärkere Substanzverlust durch den Filter in den hier durchgeführten Versuchen hindeutete.

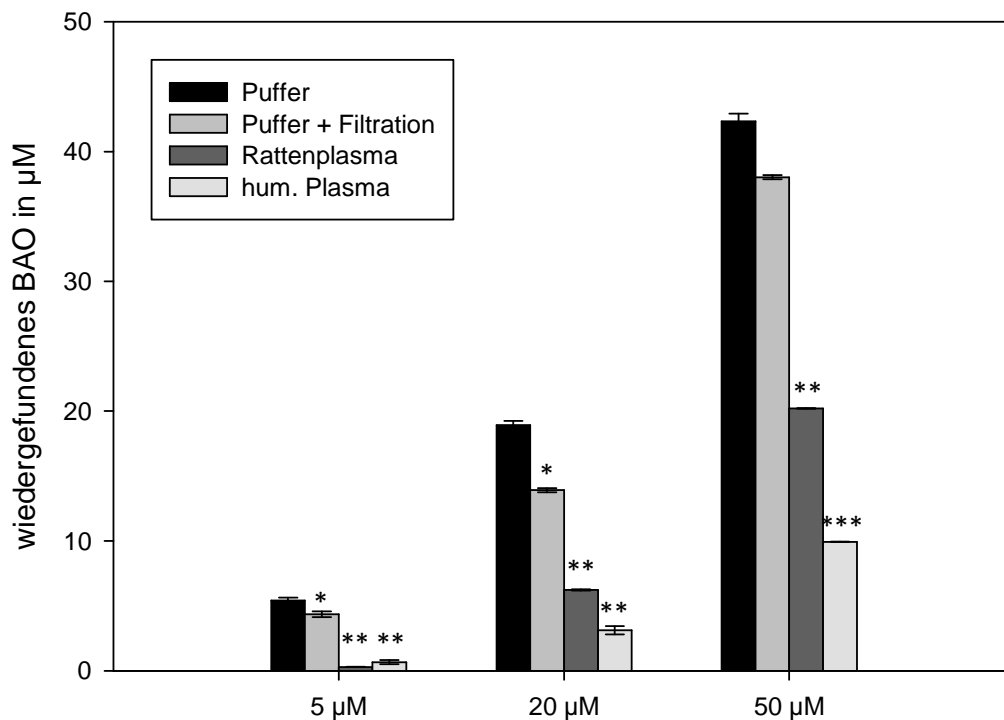


Abbildung 5-24 Wiedergefundene Konzentration an Benzamidoxim (14) in Sörensen-Phosphatpuffer (Puffer), in Sörensen-Phosphatpuffer mit Ultrafiltration (Puffer + Filtration), in Rattenplasma mit Ultrafiltration (Rattenplasma) und in humanem Plasma mit Ultrafiltration (hum. Plasma). Gezeigt sind die MW \pm STABW aus zwei Vermessungen mittels HPLC. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer; **Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer und Ultrafiltration; ***Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Rattenplasma (Student's t-Test, $p < 0.05$).

Die wiedergefundenen Konzentrationen an *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) sind in Abbildung 5-25 dargestellt. Nach Ultrafiltration wurde eine Konzentration von 45.9 ± 10.1 % an BAOMe **72** wiedergefunden. Dieses Ergebnis war für den 50 µM-Ansatz statistisch signifikant verschieden von der Konzentration der Probe in Sörensen-Phosphatpuffer ohne Ultrafiltration. Es verblieben insgesamt durchschnittlich 54.1 % des BAOMe **72** in der Filtrationseinheit und wurden der Detektion entzogen. In Abbildung 5-25 ist weiterhin erkennbar, dass *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) sehr stark an Plasmaproteine gebunden wurde, denn im Rattenplasma sowie im humanen Plasma konnte nach Ultrafiltration wenig bis kein Substrat **72** nachgewiesen werden. Der freie Anteil an BAOMe **72** in Rattenplasma betrug im Mittel 3.7 ± 6.4 %, woraus auf eine Plasmaproteinbindung von 96.3 % geschlossen werden konnte. Im humanen Plasma wurden 0.04 ± 0.07 % verglichen mit den entsprechenden Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer nach Ultrafiltration wiedergefunden, was unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Daraus ergab sich eine vollständige Plasmaproteinbindung von 100.0 %. Aufgrund der durch die zusätzliche Methylgruppe erhöhten Lipophilie von *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) im Vergleich zu BAO **14** wurde eine erhöhte Proteinbindung auch erwartet. Die erhebliche Bindung des Substrats **72** an der Filtrationseinheit wurde nicht vorhergesehen und ist vermutlich auf hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Filtermaterial zurückzuführen. Dies wirkte sich nachteilig auf die Genauigkeit der Bestimmung der Plasmaproteinbindung aus.

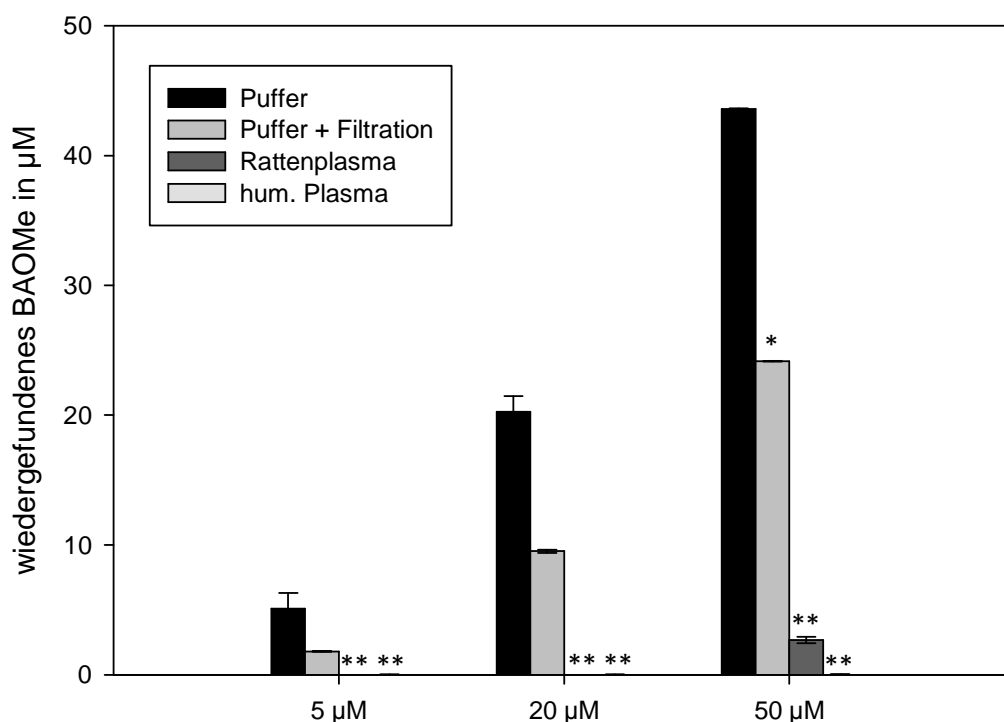


Abbildung 5-25 Wiedergefundene Konzentration an *O*-Methylbenzamidin (**72**) in Sörensen-Phosphatpuffer (Puffer), in Sörensen-Phosphatpuffer mit Ultrafiltration (Puffer + Filtration), in Rattenplasma mit Ultrafiltration (Rattenplasma) und in humanem Plasma mit Ultrafiltration (hum. Plasma). Gezeigt sind die MW \pm STABW aus zwei Vermessungen mittels HPLC. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer; **Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer und Ultrafiltration (Student's t-Test, $p < 0.05$).

In Abbildung 5-26 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Plasmaproteinbindung von BDHA2OMe **30e** graphisch dargestellt. Wie auch bei den Versuchen mit BAOMe **72** wurde eine große Menge an Substanz **30e** durch die Ultrafiltrationseinheit zurückgehalten und somit der Bestimmung entzogen. Der nach Ultrafiltration in Sörensen-Phosphatpuffer wiedergefundene Anteil an BDHA2OMe **30e** im Vergleich zu den Ansätzen ohne Ultrafiltration betrug im Mittel 51.8 ± 11.0 % und wies für den 20 µM- und den 50 µM-Ansatz einen statistisch signifikanten Unterschied zu den vergleichbaren Ansätzen ohne Zentrifugation auf. Im Filter verblieben also durchschnittlich 48.2 % der Verbindung **30e**. Bei der Bestimmung der Konzentration an *O,O'*-Di-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) im Plasma nach Ultrafiltration konnte nahezu kein Substrat **30e** nachgewiesen werden. Im Rattenplasma wurden durchschnittlich 9.8 ± 2.7 % wiedergefunden. Die Plasmaproteinbindung im Rattenplasma betrug folglich 90.2 %. In humanem Plasma konnte nach Ultrafiltration kein BDHA2OMe **30e** mehr detektiert werden, woraus auf eine vollständige Plasmaproteinbindung im humanen Plasma von 100.0 % geschlossen wurde. Alle erhaltenen Konzentrationen im Plasma unterscheiden sich statistisch signifikant von den wiedergefundenen Konzentrationen der Verbindung **30e** in Sörensen-Phosphatpuffer nach Ultrafiltration.

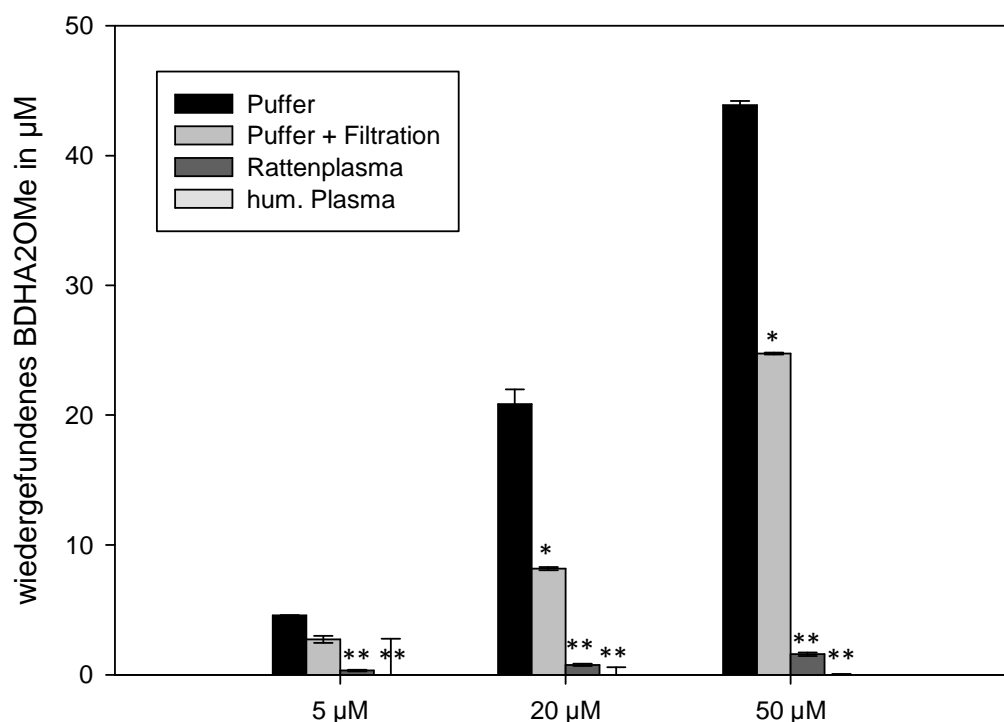


Abbildung 5-26 Wiedergefundene Konzentration an Dimethoxy-Benzamidin **30e** in Sörensen-Phosphatpuffer (Puffer), in Sörensen-Phosphatpuffer mit Ultrafiltration (Puffer + Filtration), in Rattenplasma mit Ultrafiltration (Rattenplasma) und in humanem Plasma mit Ultrafiltration (hum. Plasma). Gezeigt sind die MW \pm STABW aus zwei Vermessungen mittels HPLC. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer; **Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer und Ultrafiltration (Student's t-Test, $p < 0.05$).

Die Ergebnisse der Versuche zur Plasmaproteinbindung sind in Tabelle 5-5 zusammenfassend aufgeführt. Die Lipophilie der Verbindungen nimmt in der Tabelle von links nach rechts zu. Es wird deutlich, dass die Ultrafiltrationseinheit bei hydrophilen Verbindungen wie BA **15** wenig Substanz zurückhielt, während die hydrophoberen Verbindungen BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** den Filter zu über 50 % nicht passieren konnten. Da die detektierbaren Konzentrationen dadurch näher an die Nachweis- und Bestimmungsgrenze rückten, entstand eine zunehmende Ungenauigkeit in der Bestimmung der Plasmaproteinbindung mit zunehmender Filteradsorption der Substanzen. Abhilfe könnte durch die Vermessung noch höherer Konzentrationen geschaffen werden, jedoch lägen die Konzentrationen dann außerhalb der in Ratten detektierten Plasmakonzentrationen und wären somit unrealistisch. Weiterhin könnte der Versuch unter Verwendung einer alternativen Ultrafiltrationseinheit, welche weniger stark mit den lipophilen Verbindungen BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** interagiert, durchgeführt werden. Auch eine abweichende Bestimmungsmethode, zum Beispiel die Ultrazentrifugation oder Dialyse, könnte getestet werden. Dennoch erlauben die Ergebnisse eine tendenzielle Aussage über die Plasmaproteinbindungen von Dimethoxy-Benzamidin **30e** und dessen Metabolite **14**, **15**, und **72**.

Tabelle 5-5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Bestimmung der Plasmaproteinbindung von BDHA2OMe 30e und dessen Metabolite. Es sind die Mittelwerte aus drei unterschiedlichen Konzentrationen in Prozent angegeben.

	BA 15	BAO 14	BAOMe 72	BDHA2OMe 30e
Filterdurchgang in %	99.7	81.2	45.9	51.8
Filtrerrückstand in %	0.3	18.8	54.1	48.2
Freier Anteil (Rattenplasma) in %	92.5	34.9	3.7	9.1
Plasmaproteinbindung (Rattenplasma) in %	7.5	65.1	96.3	90.9
Freier Anteil (hum. Plasma) in %	78.2	21.2	0.0	0.0
Plasmaproteinbindung (hum. Plasma) in %	21.8	78.8	100.0	100.0

Ebenso wie die Bindung an den Filter nahm auch die Plasmaproteinbindung mit zunehmender Lipophilie zu. BAOMe **72** und BDHA2OMe **30e** lagen im Plasma nahezu vollständig proteingebunden vor. Besonders an Benzamidin (**15**) und Benzamidoxim (**14**) war zu erkennen, dass der freie Anteil der Verbindungen im humanen Plasma niedriger war im Vergleich zum Rattenplasma, die humane Plasmaproteinbindung also stärker ausgeprägt war als die murine.

5.3.6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Versuche zur Plasmaproteinbindung sind im Einklang mit den Beobachtungen der *in vivo*-Studie (siehe Kapitel 5.3.4), in denen erkennbar war, dass BDHA2OMe **30e** nur langsam eliminiert wurde und nach sechs Stunden noch in erheblichen Mengen nachweisbar war. Es bildete sich nahezu ein Plateau der Verbindung **30e** mit einer konstanten Konzentration von etwa 80 µM im murinen Plasma (siehe Abbildung 5-20). Dieser Effekt ist durch den großen plasma-proteingebundenen Anteil des BDHA2OMe **30e** von nahezu 100 % erklärbar, welcher entsprechend der sehr kleinen Gleichgewichtskonstante, dem Quotienten aus der Konzentration der freien Form und dem Komplex mit Plasmaproteinen, nur langsam freigesetzt wird. Nur der frei vorliegende Anteil kann metabolisiert und eliminiert werden. Aufgrund dessen können auch nur relativ niedrige Konzentrationen an den Metabolisierungsprodukten **14**, **15**, und **72** detektiert werden. Durch die Wiederfindungsrate des Dimethoxy-Benzamidins **30e** von 75 % ist sicher, dass auch ein Großteil der proteingebundenen Substanz nachgewiesen werden konnte. Das Plateau der Konzentration stellt also hauptsächlich an Eiweißmoleküle gebundenes BDHA2OMe **30e** dar. Dennoch stellt die CYP450-abhängige Demethoxylierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e** einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, da eine schnellere Elimination des Substrats **30e** zu beobachten sein dürfte, wenn es sofort demethoxyliert würde. Vergleicht man Abbildung 5-20 mit Abbildung 5-19 ist zu erkennen, dass die anfängliche Plasmaspiegelspitze von BDHA2OMe **30e** nicht bei dem ersten nachweisbaren Metabolit BAOMe **72** auftritt, was darauf schließen lässt, dass die metabolisierenden CYP450-Enzyme bereits gesättigt bzw. ausgelastet waren und eine höhere vorliegende Konzentration an BDHA2OMe **30e** die absolute metabolisierte Menge an BAOMe **72** nicht steigern kann. Möglicherweise wurde aus eben diesem Grund auch ein Plateau der Konzentration von Benzamidin (**15**) beobachtet. Die Cytochrom P450-abhängige Demethylierung von *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) zu Benzamidoxim (**14**) war anscheinend geschwindigkeitsbestimmend und gesättigt, die folgende mARC-abhängige Reduktion von BAO **14** zu BA **15** erfolgte vollständig und schnell durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem.

Die hohen Plasmakonzentrationen von **30e** konnten trotz hoher Plasmaproteinbindung detektiert werden, weil die Ultrafiltration nicht zur Probenaufarbeitung verwendet wurde. Die alternative

Probenaufarbeitung durch Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln und Gefriertrocknung stellte ein nahezu quantitatives Lösen der Verbindungen in Acetonitril sicher. Die beobachtete ausgezeichnete Löslichkeit aller Verbindungen in einem Gemisch aus HPLC-Fließmittel und Acetonitril in zahlreichen vorhergehenden Tests gewährleistete diese wichtige Voraussetzung.

5.4 *In vitro*-Untersuchung der Bioaktivierung von *N*-substituierten Benzamidoximen

5.4.1 Einleitung

Benzamidoxim (**14**) wird durch das *N*-reduktive Dreikomponenten-Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom-b5 und Cytochrom-b5-Reduktase zu Benzamidin (**15**) reduziert.⁸³ Auch unterschiedlich *para*-substituierte Benzamidoxime werden durch diesen Dreikomponenten-Enzymkomplex umgesetzt. Welchen genauen Einfluss der *para*-Substituent auf die Reduktion besitzt, ist Gegenstand aktueller Forschung (siehe Abbildung 5-27, R¹).²⁰⁸ Der Effekt einer Methylsubstitution des Sauerstoffs des BAO **14** wurde im Arbeitskreis von Froriep [2013] analysiert und ergab, dass mARC im rekonstituierten System nicht dazu in der Lage ist, Demethylierungsreaktionen dieser Verbindungen zu katalysieren (siehe Abbildung 5-27, R²).⁸⁶

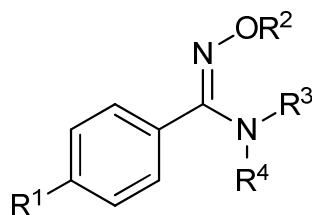


Abbildung 5-27 Unterschiedliche Substituenten R¹-R⁴ an Benzamidoxim können einen entscheidenden Effekt auf die Reduktion durch mARC besitzen.

Bisher wurde allerdings noch nicht untersucht, welchen Effekt verschiedene *N*-Substitutionen von BAO **14** auf die Reduktion zum entsprechenden *N*-substituierten Benzamidin **75** durch mARC besitzen (siehe Abbildung 5-27, R³-R⁴).

5.4.2 Zielsetzung

Durch geeignete Inkubationen sollte das Ausmaß der Reduktion *N*-substituierter Benzamidoxime **74** im Vergleich zu Benzamidoxim (**14**) durch das mARC-haltige Enzymsystem festgestellt werden (siehe Abbildung 5-28). Dabei war festzustellen, ob die Substituenten am Stickstoff einen Einfluss auf die mARC-abhängige Reduktion der Benzamidoxime **74** besitzen. Falls ein Effekt erkennbar war, sollten mögliche Erklärungen mit Hilfe der spezifischen Eigenschaften der Substituenten gefunden werden.

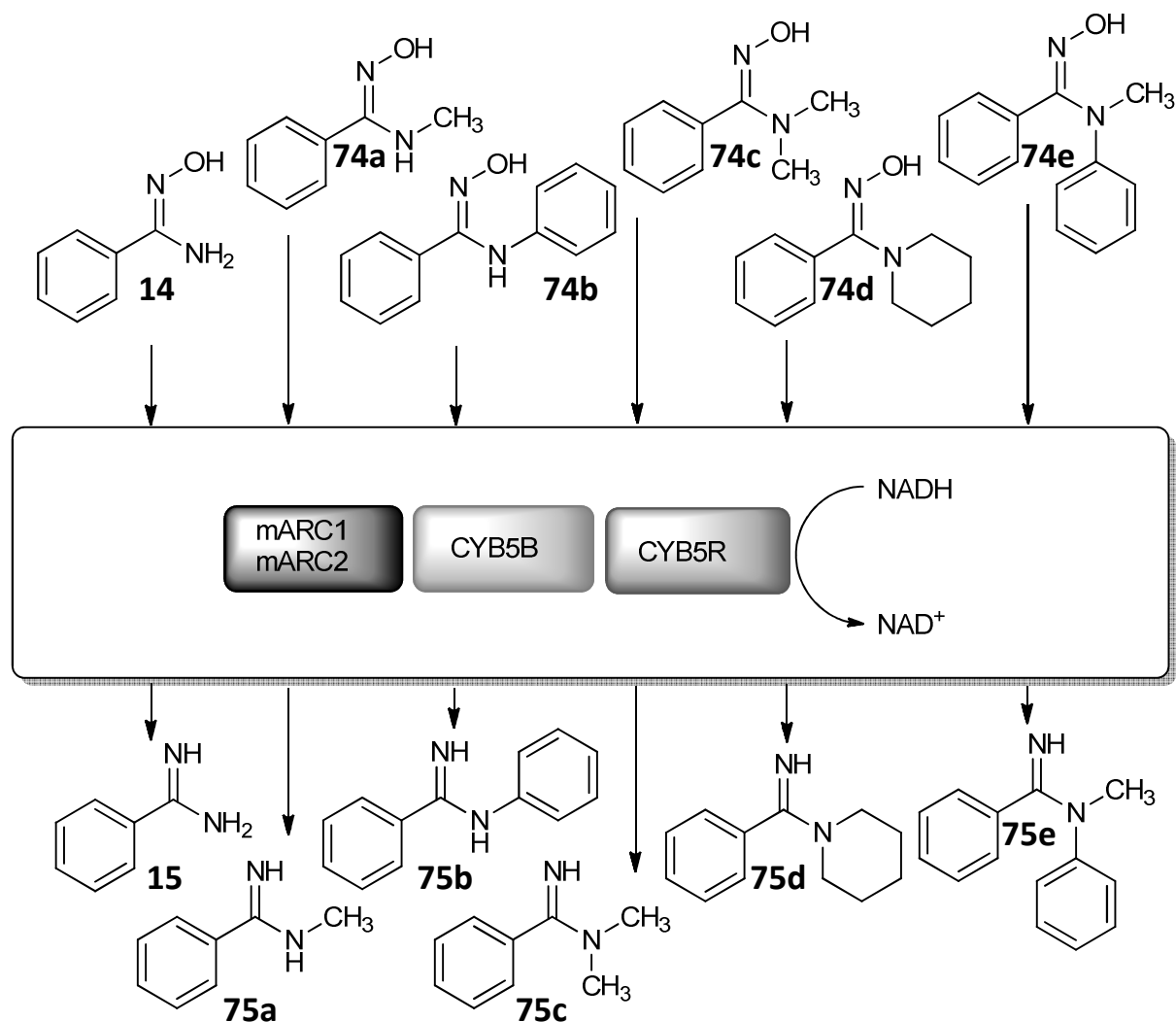


Abbildung 5-28 Die Umsetzungen von BAO **14** zu BA **15** durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem sollten mit den Umsetzungen *N*-substituierter Benzamidoxyamine **74** zu *N*-substituierten Benzamidinen **75** verglichen werden.

5.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die verwendeten Kalibrierungs- und Wiederfindungsfunktionen wurden Korrelationskoeffizienten im Bereich von $r^2 > 0.99$ bis $r^2 = 1.0000$ ermittelt.

Die Bestimmungsgrenzen der Verbindungen überschritten die Konzentration von 1 μM nicht. Die Nachweisgrenzen lagen bei 0.5 μM oder niedriger. Alle detektierten Substrate **74** und Metabolite **75** lagen mit mindestens 10 μM in deutlich höheren Konzentrationen vor.

Die Wiederfindungsrate von Benzamidin (**15**) betrug 132 %. Die Wiederfindungsraten der *N*-substituierten Benzamidine **75** wurden mit 108 % (*N*-Methylbenzamidin (BANMe **75a**)), 134 % (*N*-Phenylbenzamidin (BAPh **75b**)), 110 % (*N,N*-Dimethylbenzamidin (BA2NMe **75c**)), 140 % (1-(Benzimidoyl)piperidin (BAPip **75d**)) und 107 % (*N*-Methyl-*N*-phenylbenzamidin (BAPhMe **75e**)) bestimmt.

5.4.3.1 Inkubationen mit der äußeren Mitochondrienmembran von Schweinen (SLOMV)

Es wurden Inkubationen mit jeweils 3 mM *N*-Methylbenzamidoxim (BAONMe **74a**), *N*-Phenylbenzamidoxim (BAOPh **74b**), *N,N*-Dimethylbenzamidoxim (BAO2NMe **74c**), 2-(1-Piperidyl)benzaldoxim (BAOPip **74d**) oder *N*-Methyl-*N*-phenylbenzamidoxim (BAOPhMe **74e**) im Vergleich zu BAO **14** mit der mARC-haltigen äußeren Mitochondrienmembran aus Schweinelebern (OMV) in Phosphatpuffer pH 6.0 bei 37 °C über 20 Minuten durchgeführt. Die Ansätze enthielten 5 % DMSO zur Löslichkeitsverbesserung. Nach gegebener Zeit wurden die Reaktionen der Versuchsansätze mit äquivalentem Volumen an eiskaltem Methanol abgestoppt.

In Abbildung 5-29 sind die nachgewiesenen Konzentrationen der entsprechenden Benzamidine **75** nach Inkubation mit OMV für 20 Minuten im Vergleich zur BAO **14**-Metabolisierung dargestellt und nach der Umsetzungsrate sortiert. Es zeigte sich, dass die Metabolisierung des *N*-methylierten Benzamidoxims **74a** am stärksten innerhalb von 20 Minuten verlief. Die gefundene Konzentration an *N*-Methylbenzamidin (**75a**) war gegenüber dem detektierten Benzamidin (**15**) nach Inkubation statistisch signifikant erhöht. Die spezifische Aktivität der OMV für die Umsetzung zu BANMe **75a** betrug $48.8 \pm 3.6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ und entsprach damit 137 % der BAO **14**-Reduktion. Im Vergleich dazu lag die spezifische Aktivität der OMV für die Metabolisierung der Referenzverbindung Benzamidoxim (**14**), welche als 100 % definiert wurde, bei $35.6 \pm 0.7 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. *N*-Methylbenzamidoxim (BAONMe **74a**) war die einzige Verbindung, für die eine stärkere *N*-Reduktion im Vergleich zu BAO **14** gefunden werden konnte.

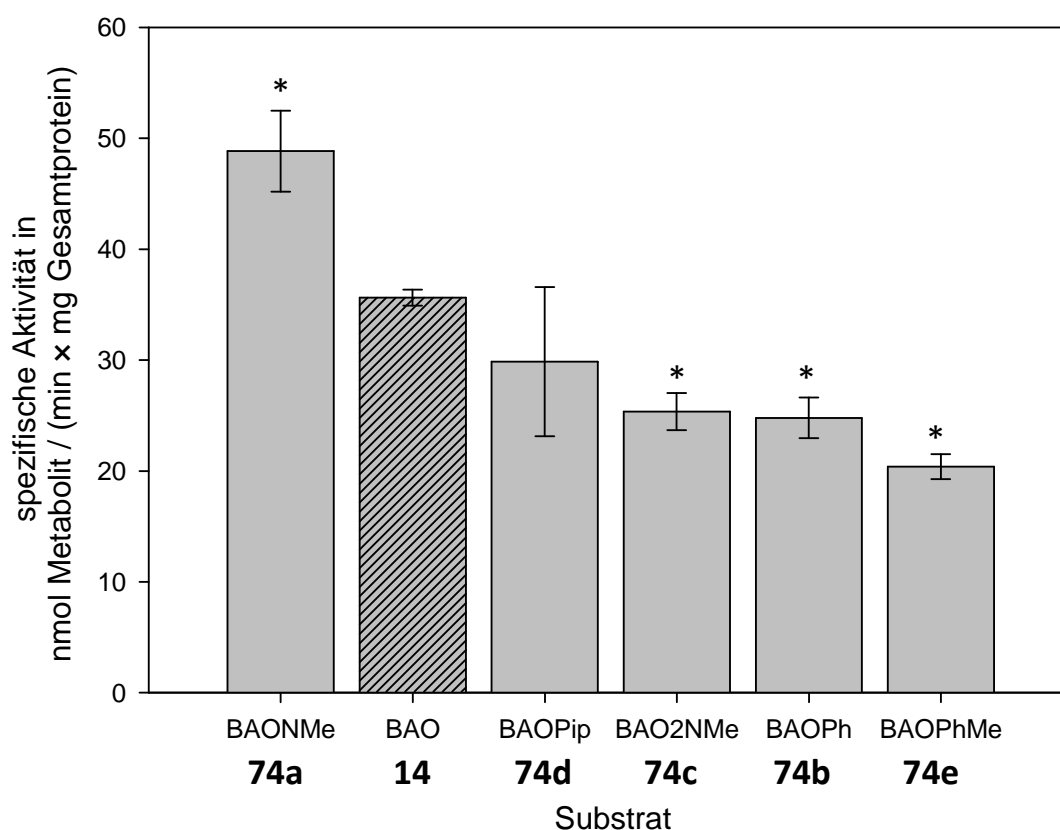


Abbildung 5-29 Konzentrationen an *N*-substituierten Benzamidinen **75** durch Umsetzungen von *N*-substituierten Benzamidoximen **74** durch OMV im Vergleich zur BAO **14**-Umsetzung bzw. BA **15**-Entstehung (strukturiert) in nmol Metabolit/(min × mg Gesamtprotein). Dargestellt sind die MW ± STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC-Analytik vermessen wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Referenzumsetzung mit BAO **14** (Student's t-Test, $p < 0.05$).

Ähnliche Umsetzungsraten wie mit der Referenzverbindung BAO **14** konnten mit BAOPip **74d** durch Inkubation mit OMV erreicht werden. Die etwas verminderte detektierte Konzentration an BAPip **75d** stellte sich als nicht statistisch signifikant gegenüber der Benzamidin (**15**)-Bildung heraus. Für die Umsetzung von 2-(1-Piperidyl)benzaldoxim (**74d**) wurde eine spezifische Aktivität von $29.9 \pm 6.7 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ermittelt. Dies entsprach etwa 84 % der BAO **14**-Reduktion.

N-Phenylbenzamidoxim (**74b**) und *N,N*-Dimethylbenzamidoxim (**74c**) wurden durch die OMV nahezu in gleichem Maße zu den entsprechenden *N*-substituierten Benzamidinen **75b** und **75c** metabolisiert. Die Umsetzungen sind mit 70 % bzw. 71 % im Vergleich zur Referenzumsetzung mit BAO **14** nach Student's t-Test statistisch signifikant vermindert. Für die Umsetzung von BAO2NMe **74c** zu BA2NMe **75c** durch die OMV wurde eine spezifische Aktivität von $25.3 \pm 1.7 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ermittelt. Die spezifische Aktivität für die Umsetzung von BAOPh **74b** zu BAPh **75b** betrug vergleichbare $24.8 \pm 1.8 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Deutlich am schwächsten wurde *N*-Methyl-*N*-phenylbenzamidoxim (**74e**) durch die äußere Mitochondrienmembran innerhalb von 20 Minuten metabolisiert. Die Konzentration an dem Metabolit *N*-Methyl-*N*-phenylbenzamidin (**75e**) war, sowohl nach dem Student's t-Test als auch nach dem Dunnett-Test, statistisch signifikant niedriger als die ermittelte Konzentration des Benzamidoxim (**14**)-Metaboliten BA **15**. Mit Hilfe des Dunnett-Tests kann die statistische Signifikanz

detektierter Differenzen vieler Datenreihen (*N*-substituierte BAOs **74**) zu einer Referenz (BAO **14**) bestimmt werden. Der Test wird als konservativ eingestuft, da es unwahrscheinlicher ist, eine statistische Signifikanz zu erhalten.²⁰⁹ Die spezifische Aktivität der OMV für die Umsetzung von BAOPhMe **74e** betrug $20.4 \pm 1.1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ und entsprach damit etwa 57 % der BAO **14**-Reduktion.

Die Ursache für die unterschiedlich ausgeprägten Metabolisierungen durch das mARC-haltige *N*-reduktive System kann in den elektronischen und sterischen Einflüssen der *N*-Substituenten begründet liegen. BAONMe **74a** wurde als einzige getestete Verbindung innerhalb von 20 Minuten stärker durch die OMV metabolisiert als Benzamidoxim (**14**). Durch den Elektronenschub der Methylgruppe fand also offensichtlich eine Aktivierung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen statt. Möglicherweise kann das mARC-Enzymsystem durch die erhöhte Elektronendichte an der funktionellen Gruppe besser an das Substrat binden. Da der Methyl-Substituent sehr klein ist, tritt keine nennenswerte sterische Abschirmung der Amidoxim-Gruppe auf.

Die Verbindung BAOPip **74d** wurde im Vergleich zu BAO **14** etwas weniger durch die OMV umgesetzt, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Die rein aliphatischen cyclisierten Substituenten des Stickstoffs führen offensichtlich zu einem Elektronenschub und damit zur Aktivierung der Wechselwirkungen mit dem Enzymsystem, welcher aber durch den abschirmenden Effekt der zweifachen Substitution des Stickstoffs wieder ausgeglichen wird. Die funktionelle Gruppe ist durch den Substituenten nicht mehr ungehindert für das mARC-System erreichbar.

Das Substrat BAO2NMe **74c** wurde signifikant geringer durch die OMV zum entsprechenden Amidin metabolisiert, verglichen mit der Benzamidoxim (**14**)-Metabolisierung. Ein Grund könnte die relativ starke Abschirmung durch die zweifache Substitution mit Methylgruppen sein. Andererseits sind Methylgruppen nicht sehr groß, weswegen eine starke sterische Abschirmung nicht zu erwarten wäre. Im Vergleich zu BAOPip **74d** müsste die Abschirmung hier größer sein, um Erklärungen im Einklang der Ergebnisse zu liefern. Möglicherweise lassen sich die beiden nicht miteinander verbundenen Methylsubstituenten schlechter durch das mARC-Enzymsystem von der funktionellen Gruppe verdrängen als zwei miteinander cyclisierte Substituenten wie der Piperidyl-Rest. Der starke elektronenschiebende Effekt der Methylgruppen wird also durch die sterische Hinderung wieder aufgehoben, sodass die Verbindung BAO2NMe **74c** trotzdem noch gut zum Amidin **75c** metabolisiert werden kann.

Die Verbindung BAOPh **74b** besitzt kontrovers wirkende Eigenschaften. Da es nur einfach am Stickstoff substituiert ist, sollte das Enzym nicht sehr stark sterisch gehindert sein, mit der funktionellen Gruppe in Wechselwirkung zu treten. Andererseits ist der Aromat aber nicht so klein wie ein Methylrest, weswegen die sterische Hinderung größer im Vergleich zu dieser sein sollte. In Bezug auf den Effekt des Substituenten auf die Elektronendichteverteilung im Molekül ist mit einer Entschirmung der Amidoxim-Gruppe durch den aromatischen Rest zu rechnen, was die Umsetzung durch mARC offensichtlich vermindert, da die Metabolisierung trotz nur einfacher Substitution der Verbindung als eher niedrig im Vergleich zu den anderen getesteten Verbindungen bestimmt wurde.

Die niedrigsten Umsetzungen innerhalb von 20 Minuten durch die SLOMV wurden mit dem Substrat BAOPhMe **74e** nachgewiesen. Dies war zu erwarten, denn die zweifache Substitution des Stickstoffs und der relativ große Phenylsubstituent schirmen die funktionelle Gruppe am stärksten vom Enzym ab, verglichen mit den anderen eingesetzten Substraten. Der Methylrest wirkt zwar elektronen-

schiebend und somit aktivierend, jedoch wird dieser Effekt durch den elektronenziehenden Phenylsubstituenten wieder relativiert. Den erhaltenen Ergebnissen zufolge würde eine zweifache Substitution des Stickstoffs mit aromatischen Resten zu einer noch schwächeren Reduktion durch das mARC-System zum entsprechenden Amidin führen.

5.4.3.2 Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC1-Enzymsystem (rhARC1)

Für die Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC1-Enzym (rhARC1) wurde ebenso verfahren wie für die Inkubationen mit der OMV (siehe Kapitel 5.4.3.1). Anstelle der OMV wurde 7.0 µg rhARC1, 75 pmol CYB5B und 7.5 pmol CYB5R eingesetzt. Anstelle des 100 mM Phosphatpuffers pH 6.0 wurde 20 mM MES-Puffer des gleichen pH-Werts verwendet.

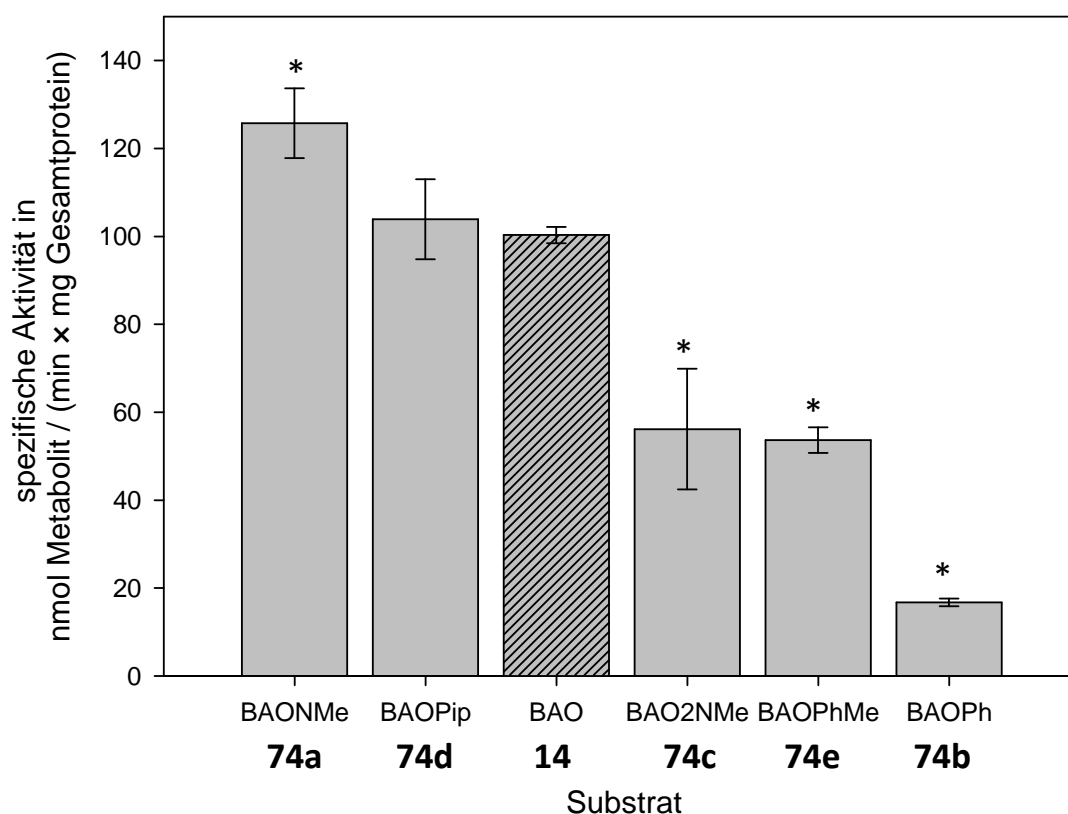


Abbildung 5-30 Konzentrationen an *N*-substituierten Benzamidinen 75 durch Umsetzungen von *N*-substituierten Benzamidoximen 74 mit dem rekombinanten humanen mARC1-Enzymsystem bezogen auf die BAO 14-Umsetzung bzw. BA 15-Entstehung (strukturiert) in nmol Metabolit \times min⁻¹ \times mg⁻¹ Gesamtprotein. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Referenzumsetzung mit BAO 14 (Student's t-Test, $p < 0.05$).

Wie in Abbildung 5-30 zu erkennen ist, wurde BAONMe **74a** durch das rekombinante humane mARC1, wie auch durch die OMV, am effektivsten zum entsprechenden Amidin **75a** reduziert. Die Metabolisierung war mit 125 % statistisch signifikant gesteigert gegenüber der Vergleichsumsetzung von Benzamidoxim (**14**), welche als 100 % definiert wurde. Die spezifische Aktivität für diese Umsetzung betrug 125.7 ± 7.9 nmol \times min⁻¹ \times mg⁻¹ (BAO **14**: 100.3 ± 1.8 nmol \times min⁻¹ \times mg⁻¹). Ebenfalls vergleichbar mit den erhaltenen Ergebnissen durch die Umsetzungen mit der OMV war

auch die Metabolisierung von BAOPip **74d** durch das rekombinante mARC1-System. Der Unterschied zur BAO **14**-Umsetzung war hier nicht statistisch signifikant. Die spezifische Aktivität für die Metabolisierung von BAOPip **74d** zum entsprechenden Amidin betrug $103.9 \pm 9.1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Die *N,N*-disubstituierten Verbindungen BAO2NMe **74c** und BAOPhMe **74e** wurden, ähnlich wie bei den Inkubationen mit der äußeren Mitochondrienmembran, nach Student's t-Test statistisch signifikant schwächer metabolisiert als BAO **14**. Die spezifischen Aktivitäten betrugen $56.2 \pm 13.7 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (BAO2NMe **74c**) und $53.7 \pm 2.9 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (BAOPhMe **74e**). Dies entsprach einer Umsetzung von 56 % bzw. 54 % im Vergleich zur BAO **14**-Reduktion. Nicht erklärbar schien hier die ungefähr gleiche Umsetzungsrate der beiden Substrate. Durch den stark elektronisch entschirmenden und sterisch abschirmenden Effekt wurde eine deutlich niedrigere Reduktionsrate des Methyl-Phenyl-substituierten Derivates **74e** erwartet. Mit den Kenntnissen über die Eigenschaften der Substituenten ließ sich dieses Resultat nicht erklären. Die hohe STABW des *N,N*-dimethylierten Substrats **74c** könnte auf eine fehlerhaft bestimmte Umsetzungsrate hindeuten.

Die schwächste Metabolisierung durch das rekombinante mARC1-System mit nur 17 % im Vergleich zur BAO **14**-Reduktion wurde mit dem Substrat BAOPh **74b** nachgewiesen. Diese Abweichung war sowohl als Ergebnis des Student's t-Tests als auch des Dunnett-Tests statistisch signifikant. Das Enzym besaß für die Reduktion der Verbindung **74b** eine spezifische Aktivität von $16.7 \pm 0.9 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Auch dieses Resultat wurde nicht erwartet, denn BAOPh **74b** ist nur einfach am Stickstoff substituiert, weswegen keine starken sterischen Behinderungen der Substrat-Enzym-Wechselwirkungen stattfinden sollten. Der elektronenziehende Effekt des Aromaten würde ebenfalls bei BAOPhMe **74e** auftreten, was deutlich stärker sterisch gehindert vorliegt und somit im Vergleich zu BAOPh **74b** schwächer metabolisiert werden sollte. Andererseits ist es möglich, dass der elektronenschiebende Effekt durch die Methylgruppe von BAOPhMe **74e** einen größeren aktivierenden Einfluss besitzt als die sterische Abschirmung aktivitätshemmend wirkt. In diesem Fall aber hätte auch die Umsetzung des *N,N*-dimethylierten Substrats **74c** deutlich höher liegen müssen.

5.4.3.3 Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC2-Enzymsystem (rhARC2)

Für die Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC2-System wurde ebenso verfahren wie für die Inkubationen mit der OMV (siehe Kapitel 5.4.3.1). Anstelle der OMV wurde 7.0 µg rhARC2, 75 pmol CYB5B und 7.5 pmol CYB5R eingesetzt. Anstelle des 100 mM Phosphatpuffers pH 6.0 wurde 20 mM MES-Puffer des gleichen pH-Werts verwendet.

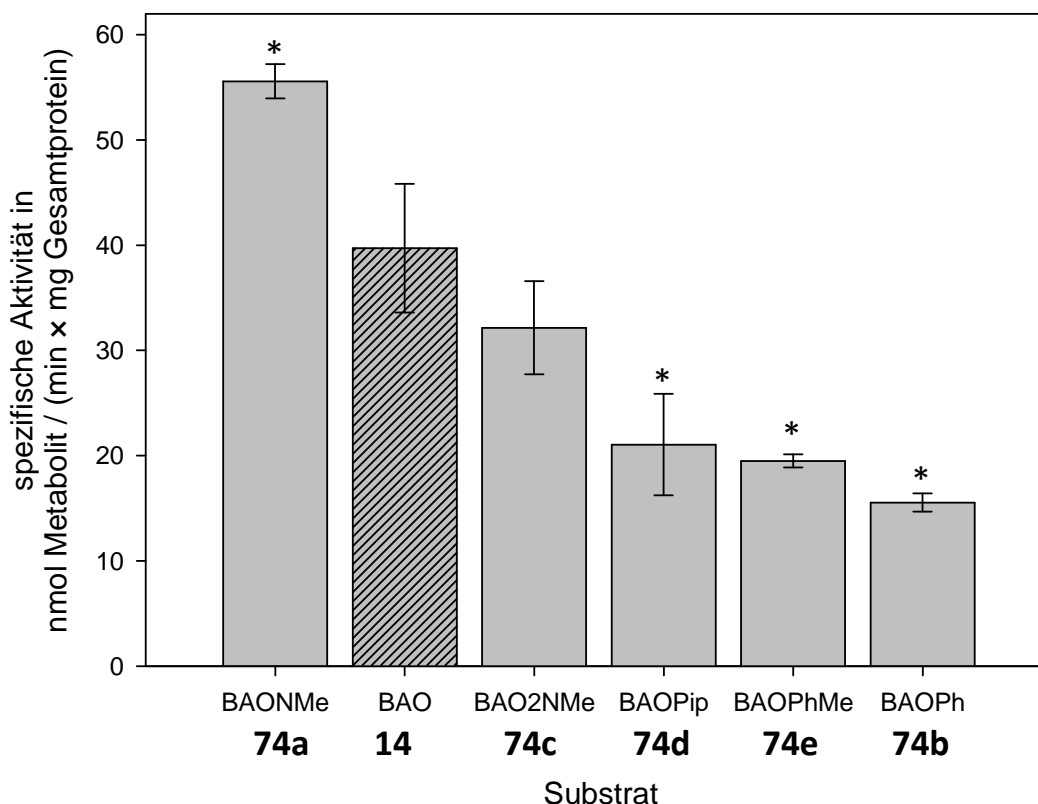


Abbildung 5-31 Konzentrationen an *N*-substituierten Benzamidinen **75** durch Umsetzungen von *N*-substituierten Benzamidoximen **74** mit dem rekombinanten humanen mARC2-Enzymsystem bezogen auf die BAO **14**-Umsetzung bzw. BA **15**-Entstehung (strukturiert) in nmol Metabolit \times min⁻¹ \times mg⁻¹ Gesamtprotein. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Referenzumsetzung mit BAO **14** (Student's t-Test, $p < 0.05$).

In der Abbildung 5-31 sind die Umsetzungen der verschiedenen *N*-substituierten Benzamidoxime **74** durch das rekombinante humane mARC2-Enzymsystem bezogen auf die Metabolisierung der Referenzverbindung Benzamidoxim (**14**) graphisch dargestellt und der Umsetzungsrate nach geordnet.

Wie auch bei den Untersuchungen mit der OMV und mit mARC1 (siehe Kapitel 5.4.3.1 und 5.4.3.2) wurde auch bei den Inkubationen mit mARC2 die höchste Reduktion bei Verwendung des Substrats BAONMe **74a** beobachtet. Die spezifische Aktivität des mARC2-Systems bei diesem Substrat **74a** war nach Student's t-Test statistisch signifikant höher im Vergleich zur BAO **14**-Metabolisierung und betrug 55.6 ± 1.6 nmol \times min⁻¹ \times mg⁻¹, was 140 % der BAO **14**-Reduktion entsprach.

Das Substrat BAO2NMe **74c** wurde mit 81 % der BAO **14**-Reduktion nicht statistisch signifikant geringer durch das mARC2-haltige Enzymsystem zum entsprechenden Amidin **75c** umgesetzt. Die spezifische Aktivität des mARC2-Systems für die Reduktion von BAO2NMe **74c** betrug 32.2 ± 4.4 nmol \times min⁻¹ \times mg⁻¹. Die im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten relativ hohe Umsetzungsrate ist durch die elektronenschiebenden Methylsubstituenten, welche aktivierend auf die Enzym-Substrat-Interaktionen wirken, erklärbar. Dennoch lieferten die Untersuchungen mit der OMV und dem mARC1-Enzymsystem abweichende Ergebnisse, besonders im Vergleich zu BAOPip **74d**, welches bei der Inkubation mit diesen Proteinen verstärkt umgesetzt wurde. Bei allen

Inkubationen wurde aber eine 60-80 %ige Umsetzung verglichen mit der Metabolisierung von BAO **14** detektiert.

Bei den Umsetzungen von BAOPip **74d** mit der OMV und mit dem rekombinanten mARC1-System wurde eine mit BAO **14** vergleichbare Reduktion nachgewiesen. Bei den Inkubationen mit dem mARC2-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystem hingegen wurde eine statistisch signifikant geringere Umsetzung detektiert. Die spezifische Aktivität des rekombinanten humanen mARC2-Enzymsystems für die Metabolisierung von BAOPip **74d** zum entsprechenden Amidin **75d** betrug $21.0 \pm 4.8 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ und entsprach damit 53 % der BAO **14**-Reduktion. Das Ergebnis ist mit der sterischen Abschirmung der funktionellen Gruppe durch die beiden Alkylsubstituenten erklärbar, welche cyclisiert vorliegen. Allerdings wurde erwartet, dass die relativen Umsetzungen der drei Testsysteme sich ähneln, was bei BAOPip **74d** nicht der Fall war.

Die beiden *N*-Phenylsubstituierten Benzamidoxime BAOPh **74b** und BAOPhMe **74e** wurden am geringsten durch das mARC2-System metabolisiert. Die spezifischen Aktivitäten der Substrate betrugen $19.5 \pm 0.6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (BAOPhMe **74e**) und $15.5 \pm 0.9 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (BAOPh **74b**). Verglichen mit der BAO **14**-Reduktion entsprach dies einer Metabolisierung von 49 % bzw. 39 %. Nur die Umsetzung von BAOPh **74b** durch das rhmARC2-System wurde durch den Dunnett-Test als statistisch signifikant niedriger im Vergleich zur BAO **14**-Metabolisierung berechnet. Insgesamt gleicht das Resultat den Untersuchungen mit dem mARC1-Enzymsystem, weicht aber von den Ergebnissen mit der OMV als Proteinquelle ab. Tendenziell scheint der aromatische Substituent eine stark deaktivierende Wirkung auf die *N*-Reduktion der Amidoxime **74** zu den Amidinen **75** durch mARC-haltige Enzyme zu besitzen.

5.4.3.4 Korrelationen der Umsetzungen mit dem pK_a -Wert und NMR-Daten

Es wurden Versuche unternommen, die erhaltenen Ergebnisse mit einigen physikochemischen Daten der eingesetzten Substrate zu korrelieren (siehe Tabelle 5-6). Sinnvoll erschien die Korrelation mit den pK_a -Werten, da die Protonierbarkeit und Deprotonierbarkeit der Stickstoffatome stark von den *N*-Substituenten und deren elektronische Einflüsse abhängig ist. Außerdem zeigen die chemischen Verschiebungen der Stickstoffatome *para*-substituierter Benzamidoxime (**14**) signifikante Korrelationen mit den Hammett-Konstanten σ , welche die elektronischen Einflüsse der *para*-Substituenten widerspiegeln.¹⁶⁸ Zu erwarten ist also auch eine Korrelation zwischen den die Elektronendichte beeinflussenden Substituenten des Aminstickstoffs von Benzamidoximen **74** mit experimentell gewonnenen Daten zur Enzymaktivität an den entsprechenden Verbindungen.

Tabelle 5-6 Korrelationen der experimentell gewonnenen Daten zur Metabolisierung (*M*) aus den Inkubationen der *N*-substituierten Benzamidoxime **74** (*M* in % bezogen auf die BAO **14**-Umsetzung) mit den pK_a -Werten aus unterschiedlichen Quellen, der ^1H -NMR-chemischen Verschiebung (δ in ppm) des OH-Protons und der ^{15}N -NMR-chemischen Verschiebungen (δ in ppm) des Aminstickstoffs und des Iminstickstoffs.

Nummer	Korrelationspartner	Protein	Korrelationsgleichung	Korrelationskoeffizient
1	pK_a (berechnet mit MarvinSketch) ¹¹⁹	SLOMV	$M(pK_a) = 7.0 pK_a + 53.1$	$r^2 = 0.323$
2		rhmARC1	$M(pK_a) = 13.8 pK_a + 13.2$	$r^2 = 0.483$
3		rhmARC2	$M(pK_a) = 12.9 pK_a + 18.6$	$r^2 = 0.472$
4	pK_a (ACD/Labs) ²¹⁰	SLOMV	$M(pK_a) = 9.9 pK_a + 45.9$	$r^2 = 0.845$
5		rhmARC1	$M(pK_a) = 10.4 pK_a + 34.7$	$r^2 = 0.363$
6		rhmARC2	$M(pK_a) = 12.9 pK_a + 26.2$	$r^2 = 0.623$

Nummer	Korrelationspartner	Protein	Korrelationsgleichung	Korrelationskoeffizient
7	$\delta(^1\text{H-NMR OH})$	SLOMV	$M(\delta) = -11.7 \delta + 198.9$	$r^2 = 0.090$
8		rhMARC1	$M(\delta) = -38.6 \delta + 452.8$	$r^2 = 0.379$
9		rhMARC2	$M(\delta) = -26.4 \delta + 335.0$	$r^2 = 0.200$
10	$\delta(^{15}\text{N-NMR =NOH})$	SLOMV	$M(\delta) = -1.00 \delta + 390.8$	$r^2 = 0.655$
11		rhMARC1	$M(\delta) = -1.02 \delta + 389.5$	$r^2 = 0.265$
12		rhMARC2	$M(\delta) = -1.32 \delta + 481.4$	$r^2 = 0.494$
13	$\delta(^{15}\text{N-NMR -NR}^1\text{R}^2)$	SLOMV	$M(\delta) = -0.81 \delta + 142.0$	$r^2 = 0.209$
14		rhMARC1	$M(\delta) = -1.85 \delta + 206.1$	$r^2 = 0.417$
15		rhMARC2	$M(\delta) = -2.17 \delta + 229.3$	$r^2 = 0.641$

Anhand der Korrelationskoeffizienten r^2 der Tabelle 5-6 ist zu erkennen, dass keine eindeutige Korrelation des pK_a -Wertes mit den gewonnenen Daten möglich war. Auch die chemischen Verschiebungen der beiden Stickstoffatome der funktionellen Gruppe sowie des OH-Protons korrelieren nicht überzeugend mit den experimentellen Daten der Inkubationsversuche. Die Korrelationskoeffizienten konnten auch durch Einbeziehung der Taft-Konstante E_s als Maß für die sterischen Effekte nicht erhöht werden. E_s wurde ursprünglich für die sterische Beeinflussung der Hydrolyse eines substituierten Carbonsäureesters und *o*-Benzoessäureesters bestimmt und ist bei sterisch anspruchsvollen Substituenten kleiner. Interessant ist aber, dass cyclisierte Substituenten diese Reaktion tendenziell weniger behinderten als eine zweifache Alkylierung, wobei die Größe des Rings ebenfalls eine Rolle spielte.²¹¹ Auch bei den durchgeführten Inkubationen zeigte sich eine schwach bessere Umsetzung des BAOPip **74d** mit cyclisierten *N*-Substituenten im Vergleich zu BAO2NMe **74c** mit freien Alkylresten. Trotz der kleinen Werte für r^2 können aus den Korrelationsgleichungen Tendenzen abgeleitet werden, welche sich bei allen für die Inkubationen verwendeten Proteinen ähneln. Beispielhaft sind in Abbildung 5-32 zwei Korrelationspartner mit den entsprechenden Beziehungen zur OMV, zu rhMARC1 und zu rhMARC2 graphisch dargestellt. In Diagramm A der Abbildung 5-32 ist erkennbar, dass die Umsetzung durch mARC-haltige Enzyme bei größeren pK_a -Werten (die Werte wurden der Software ACD/Labs entnommen) tendenziell auch stärker ausgeprägt ist.²¹⁰ Die pK_a -Werte, welche mit dem Internetprogramm MarvinSketch berechnet wurden, ergaben die gleiche Tendenz.¹¹⁹ Der Korrelation B der Abbildung 5-32 kann entnommen werden, dass die Umsetzungsraten bei kleinen chemischen Verschiebungen des doppelt gebundenen Stickstoffs besonders hoch sind. Kleinere chemische Verschiebungen kommen durch Abschirmung dieses Stickstoffatoms zustande und können durch elektronenschiebende Substituenten am Aminstickstoff wie Alkylreste verursacht werden. Die Tendenzen der übrigen in Tabelle 5-6 aufgelisteten chemischen Verschiebungen der Atome der funktionellen Gruppe als Korrelationspartner ähneln dem in Abbildung 5-32, B gezeigten Beispiel, was dem negativen Anstieg der entsprechenden Korrelationsgeraden entnommen werden kann. Auch für die chemische Verschiebung des Aminstickstoffs und des OH-Protons gilt also tendenziell: Je größer die chemische Verschiebung, desto kleiner die Umsatzrate durch mARC-haltige Proteine.

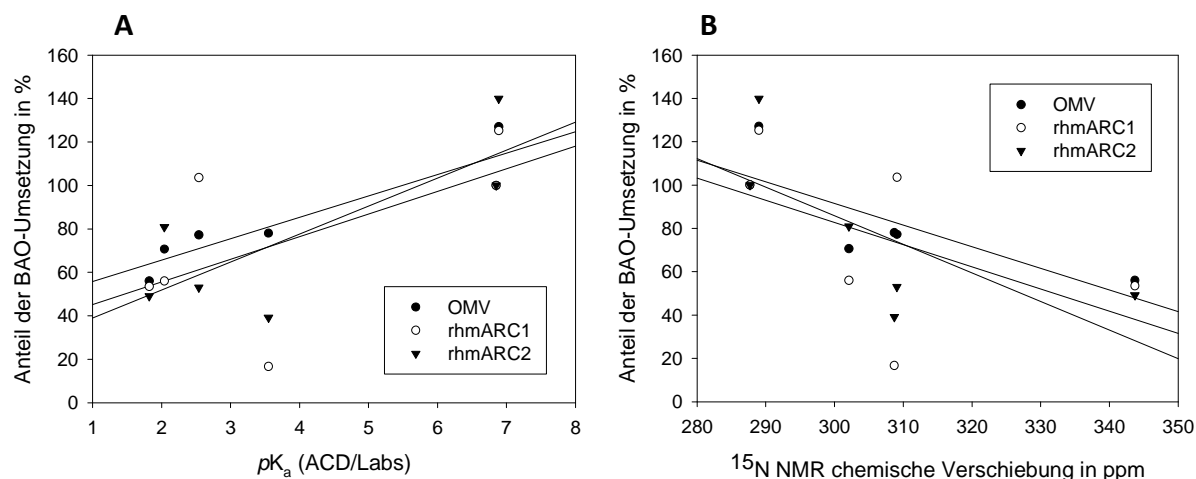


Abbildung 5-32 Regressionsgeraden der relativen Umsetzungen von *N*-substituierten Benzamidoximen **74** bezogen auf die BAO **14**-Umsetzung in % durch die Proteine OMV, rhmARC1 und rhmARC2 mit den pK_a -Werten der *N*-Substituierten Benzamidoxime **74** (A) und mit den ^{15}N -chemischen Verschiebungen in ppm (B).

Die starke Abweichung der einzelnen Datenpunkte in Abbildung 5-32 (A und B) verdeutlichen neben den kleinen Korrelationskoeffizienten aber, dass keine eindeutige Beziehung besteht. Offensichtlich sind einige weitere Moleküleigenschaften bei der Beurteilung des Ausmaßes der Reduzierbarkeit eines Moleküls durch das mARC-System wesentlich. Leider gibt es bisher keine Kristallstruktur des Enzyms. Zur Bestimmung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen steht die Methode des *Molecular Modelling* nach erfolgreicher Kristallisierung zur Verfügung.

5.4.4 Zusammenfassung

Vergleichend ist in Abbildung 5-33 zu erkennen, dass sich die Metabolisierungen der *N*-substituierten Benzamidoxime **74** durch die verschiedenen eingesetzten mARC-haltigen Proteine im Verhältnis zur BAO **14**-Reduktion ähneln. Die Umsetzungen durch die SLOMV und durch das rekombinante humane mARC2-System scheinen sich stärker zu ähneln als die der SLOMV und rhmARC1, denn in der Reihenfolge der Metabolisierungsraten wurden nur BAO2NMe **74c** und BAOPip **74d** signifikant unterschiedlich umgesetzt. Als Begründung könnte die Verteilung von mARC1 und mARC2 in unterschiedlichen Spezies dienen. Generell besitzen die unterschiedlichen Spezies nach aktuellem Wissensstand eine dominierende mARC-Isoform, während die andere Isoform in der gleichen Spezies in geringerem Ausmaß exprimiert wird. Im Schwein kommt wahrscheinlich überwiegend die mARC2-Isoform vor. Da auch die äußere Mitochondrienmembran OMV vom Schwein stammte, waren Ähnlichkeiten zu erwarten. Dennoch ist die Einteilung in mARC1 und mARC2 zwischen den Spezies nicht eindeutig geklärt, da die genetischen Ähnlichkeiten relativ hoch sind. Möglich wäre also auch, dass mARC1 des Menschen der porcinen mARC2-Isoform entspricht, wenngleich sich die Eigenschaften bezüglich der katalysierten Reaktionen der beiden Isoformen nicht unterscheiden.¹⁸²

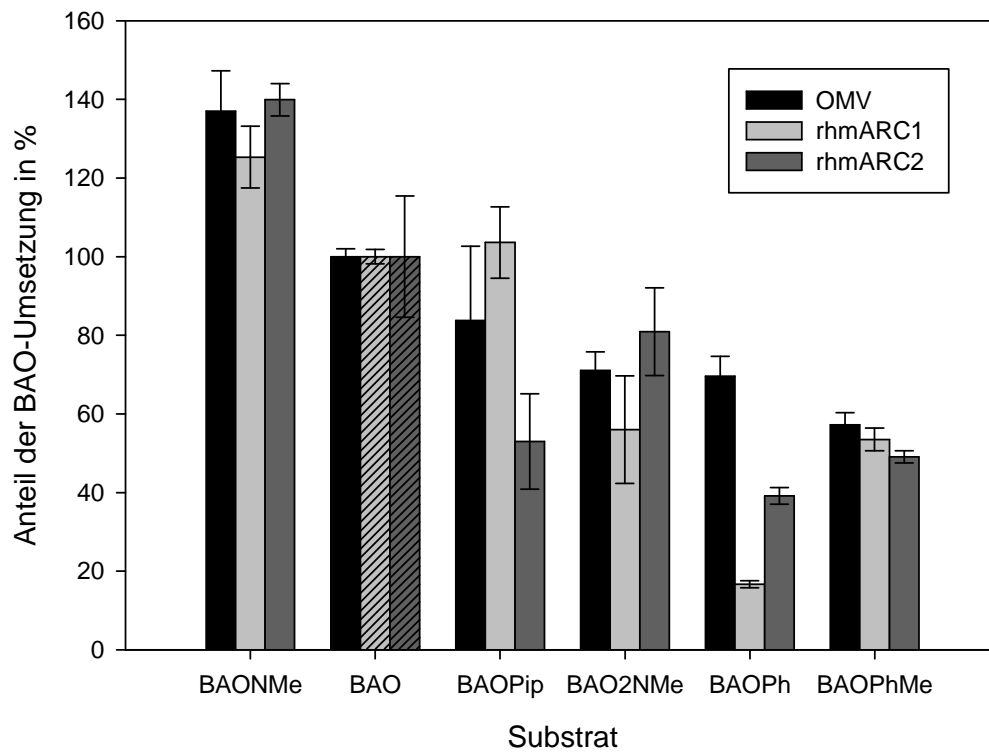


Abbildung 5-33 Vergleich der Metabolisierung der *N*-substituierten Benzamidoxime 74 durch die mARC-haltigen Proteine OMV, rhmARC1 und rhmARC2 bezogen auf die Umsetzung von BAO 14 in % (strukturiert). Die Substrate 74 sind nach der Umsatzrate durch die OMV geordnet. Dargestellt sind die MW \pm STABW aus zwei Ansätzen, welche jeweils zweimal mittels HPLC vermessen wurden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Amidine sind als funktionelle Gruppe Bestandteil zahlreicher Arzneistoffmoleküle und für deren Wirkung essenziell. Durch die stark basischen Eigenschaften sind amidinhaltige Verbindungen sehr schlecht oral bioverfügbar. Die Hydroxylierung von Amidinen stellt ein bewährtes Prodrug-Prinzip dar. Durch einfache Hydroxylierung eines Stickstoffatoms kann die Basizität eines Amidins bereits enorm reduziert werden. Nachgewiesen ist auch die Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit von Modellverbindungen mit zweifach hydroxylierten Stickstoffatomen, den Dihydroxyamidinen. Die Synthese dieser potenziell sehr geeigneten Prodrugs erwies sich in der Vergangenheit häufig als problematisch. Substanzbeispiele, welche diese funktionelle Gruppe enthalten, sind rar. Aufgrund dessen sollte ein auf viele Verbindungen übertragbarer Syntheseweg zur Darstellung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen entwickelt werden. Ziel war es außerdem, durch geeignete Untersuchungen die erfolgreiche Aktivierung von Modell-Prodrugs zum entsprechenden Amidin als modellhafte Wirkform zu belegen.

Es ist gelungen, eine geeignete Synthesestrategie zur Darstellung diverser *N,N'*-Dihydroxybenzamidine (BDHAs, **9**) zu entwickeln. Die Übertragbarkeit der Methode auf viele Verbindungen als potenzielle Prodrugs wurde durch die Darstellung einiger *para*-substituierter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **9b-g** nachgewiesen. Diese Moleküle waren bisher nicht literaturbeschrieben. Dennoch bereitete die Synthese *para*-aminosubstituierter BDHAs **9a,i,k,l** auf dem etablierten Syntheseweg Probleme, da die Chlorierung der *p*-Aminobenzaldoxime **17a,i,k,l** zu vielen Nebenprodukten, nicht aber zu den entsprechenden Hydroxamsäurechloriden **18a,i,k,l** führte. Durch die Entwicklung geeigneter Schutzgruppenstrategien mit *O,O'*-ditetrahydropyranylierten- und *O,O'*-di-*tert*-butyldimethylsilylierten *para*-Nitro-*N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **27h**, **28h** als Zwischenstufe konnte auch *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) als einfachstes phenyloges Dihydroxyguanidin und damit als interessantestes *p*-Amino-Dihydroxybenzamidin **9** über diesen Umweg gewonnen werden.

Zusätzlich wurde eine Reihe *O*-methylierter (**31/31'c-g**, **30c-g**), -benzylierter (**10/10'b-h**, **32 b-h**), -tetrahydropyranylierter (**27a-h**), -*tert*-butyldimethylsilylierter (**28a,b,e,h**) und -*tert*-butyldiphenylsilylierter (**33a,h**) *para*-substituierter BDHAs auf einem ähnlichen Reaktionsweg synthetisiert. Außerdem konnte ein allgemeiner Syntheseweg zur Darstellung von cyclischen *N,O*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen **13d,i,k** etabliert werden. Bei den Stabilitätsuntersuchungen stellte sich heraus, dass ein großer Vorteil der zweifachen Substitution der Dihydroxyamidin-Gruppe die sehr gute Stabilität im Wässrigen ist. Im Einklang mit bereits in der Vergangenheit durchgeführten Untersuchungen zur Beständigkeit verhält sich BDHA **9e** besonders in neutralen und basischen Puffermedien sehr instabil, was nachteilig für die Funktion als Prodrug nach Übertragung der funktionellen Gruppe auf Arzneistoffmoleküle sein kann. Als Hauptprodukt der Stabilitätsuntersuchungen wurde neben dem bekannten Zerfallsprodukt Benzamidoxim (**14**) ein in diesem Zusammenhang bisher nicht beschriebenes Dimerisierungsprodukt (Dimer **64c**) des intermediär

entstehenden Benzonitriloxids **99** detektiert und dessen Struktur aufgeklärt, da verschiedene Anlagerungsmöglichkeiten bestanden. Durch die Zweifachsubstitution der Dihydroxyamidin-Sauerstoffatome ist dieses Stabilitätsproblem behoben. Auch die cyclischen Vertreter der Dihydroxybenzamidine **13d,i,k** zeigen eine erhöhte Stabilität. Weiterhin dienen die *O,O'*-disubstituierten Dihydroxybenzamidine als Synthese-Hilfsmittel zur Darstellung schwer zugänglicher BDHAs. Die sich herausgestellten physikochemischen Vorteile von *O,O'*-disubstituierten Dihydroxybenzamidinen könnten mit Hilfe der etablierten Synthesemethoden auf geeignete amidinhaltige Arzneistoffmoleküle übertragen werden und deren Eigenschaften verbessern.

Alle synthetisierten neuen Verbindungen wurden vollständig NMR-spektroskopisch charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die *O*-methylierten- **31/31'c-g** und *O*-benzylierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidine **10/10'b-h** in zwei tautomeren Formen nahezu im Verhältnis 1:1 nebeneinander vorkommen. Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Tautomeren in etwa den gleichen Energiegehalt besitzen. Zwar könnte die Substitution bevorzugt an einem bestimmten Sauerstoffatom erfolgen, jedoch liegen beide Isomere durch Tautomerie in DMSO-*d*₆ thermodynamisch beinahe im Gleichgewicht vor. Das tendenziell überwiegend substituierte Sauerstoffatom unterscheidet sich interessanterweise bei der Methyl- und bei der Benzylsubstitution. Während *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine **31/31'c-g** im leichten Überschuss als hydroxylaminsubstituierte Tautomere **31'c-g** vorliegen, überwiegt bei den *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen **10/10'b-h** das oximsubstituierte Tautomer **10b-h**.

Die Versuche, die NMR-spektroskopisch erhaltenen Daten mit den elektronischen Einflüssen der *para*-Substituenten, ausgedrückt durch die Hammett-Konstanten σ , in Korrelation zu bringen, waren in vielen Fällen erfolgreich. Alle Protonen der funktionellen Gruppe der synthetisierten Dihydroxybenzamidine korrelieren signifikant mit den Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten, wobei das Oxim-Wasserstoffatom am empfindlichsten auf die Änderung der Elektronenverteilung reagiert. Überraschenderweise korrelieren zwar nicht die zentralen Kohlenstoffkerne der Dihydroxyamidin-Gruppe mit den Elektronendichteveränderungen durch den *para*-Substituenten σ , jedoch aber die direkt sauerstoffgebundenen Kohlenstoff- und Siliziumatome der *O*-Substituenten trotz erheblicher Entfernung zum Effektor in *para*-Position des Aromaten. Außerdem zeigt der Imin-Stickstoffkern aller synthetisierten Dihydroxyamidine eine signifikante Abhängigkeit von der Hammett-Konstante σ , während das Amin-Stickstoffatom keinen Zusammenhang erkennen lässt. Durch Korrelation der chemischen Verschiebungen der Wasserstoffkerne in *para*-Position zu ausgewählten Substituenten mit deren Hammett-Konstanten σ konnten die theoretischen σ -Werte der synthetisierten Dihydroxyamidin-Gruppen bestimmt werden. Dadurch ist auch der Effekt dieser funktionellen Gruppen auf einen möglichen Arzneistoffrest abschätzbar – elektronisch gleichen die Dihydroxyamidin-Funktionen mit etwa $\sigma = 0.3$ einem Brom-Substituenten mit $\sigma = 0.26$. Durch die detektierten Zusammenhänge der elektronischen Einflüsse mit den chemischen Verschiebungen können nun im Umkehrschluss durch Aufnahme von NMR-Spektren Rückschlüsse auf die Elektronendichteverteilung in der funktionellen Gruppe gewonnen werden, welche wichtige Informationen für potenzielle Interaktionen mit metabolisierenden Enzymen liefern können. Geeignete Inkubationen von unterschiedlich *para*-substituierten stabilen Dihydroxybenzamidinen (wie etwa *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe, **30e**)) könnten die Übertragbarkeit der Korrelationsdaten auf tatsächliche Enzym-Substrat-Wechselwirkungen experimentell überprüfen.

Der Metabolismus einiger ausgewählter *N,N'*-Dihydroxybenzamidine wurde durch Inkubationsstudien mit CY450- und mARC-haltigen Proteinen untersucht. Während das *O*-mono-methylierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidin **31/31'e** und BDHA **9e** spontan unter physiologischen Bedingungen zu Benzamidoxim (**14**) zerfallen, sind für die Demethylierung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-di-hydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e**) Cytochrom P450-Enzyme essenziell. So wurde die Erwartung bestätigt, dass die Modell-Wirkform Benzamidin (**15**) bei ausschließlicher Inkubation mit mARC-haltigen Enzymen nur bei Verwendung des Substrats *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**), nicht aber mit BDHA2OMe **30e** entsteht. Dennoch gelingt die Aktivierung des modellhaften Prodrugs Dimethoxy-Benzamidin **30e** durch gleichzeitige Inkubation von mARC- und Cytochrom P450-haltigen Proteinfractionen. Vertiefende Untersuchungen zur Bestimmung der für die oxidative Desalkylierung von BDHA2OMe **30e** verantwortlichen CYP450-Isoenzyme ergaben besonders hohe Umsetzungsraten durch CYP2B6. Die relative Häufigkeit dieses Isoenzym in der menschlichen Leber ist sehr gering. So stellt sich unter Beachtung der mengenmäßigen Verbreitung der Isoenzyme im Menschen das CYP2C9 als das CYP450-Enzym mit der wahrscheinlich größten physiologischen Bedeutung für die Aktivierung von Dimethoxy-Benzamidin **30e** heraus. Die CYP450-abhängige Aktivierung von Arzneistoffen ist nicht ungewöhnlich: Es werden beispielsweise die Analgetika Tramadol und Codein durch eine CYP2D6-katalysierte *O*-Demethylierung in aktivere Metabolite überführt und das blutdrucksenkende Losartan CYP2C9-abhängig zur wirksamen Carbonsäure oxidiert.^{198–200} Durch gemeinsame Inkubation von BDHA2OMe **30e** und CYP2C9- bzw. CYP2B6-Substraten mit den zugehörigen Enzymquellen in den physiologischen Konzentrationen könnte weiterführend ermittelt werden, ob physiologisch relevante Wechselwirkungen zwischen den Substraten zu erwarten sind. Außerdem könnten substratkonzentrationsabhängige Inkubationen von BDHA2OMe **30e** mit den verschiedenen CYP450-Isoenzymen zur Ermittlung der K_m -Werte, also der Affinitäten zu den Enzymen, zusätzliche Informationen zur physiologischen Bedeutung dieser Metabolisierungen liefern.

Die *in vivo*-Untersuchung der Aktivierung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e**) an Ratten belegt die Benzamidin (**15**)-Bildung durch physiologisches Vorhandensein von mARC-haltigen Proteinen und CYP450-Enzymen. Bemerkenswert war die langsame Elimination des Modell-Prodrugs **30e**, welches auch sechs Stunden nach oraler Gabe immer noch in hoher Konzentration nachzuweisbar war. Weiterführende Untersuchungen ergaben eine hohe Plasmaproteinbindung der Verbindung **30e**, was den Plateau-Effekt der *in vivo*-Konzentration von BDHA2OMe **30e** erklärt. Als direktes Cytochrom P450-katalysiertes Metabolismus-Produkt konnte *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) nachgewiesen werden, welches bei den vorhergegangenen *in vitro*-Inkubationsversuchen nicht entstand. Diese erste *O*-Demethylierungsreaktion erwies sich als geschwindigkeitsbestimmend und ist gefolgt von der ebenfalls langsamen zweiten *O*-Demethylierung dieses Zwischenproduktes **72** zum Benzamidoxim (**14**). Da BAO **14** unmittelbar und vollständig durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem zu Benzamidin (**15**) umgesetzt wird, konnte es nicht nachgewiesen werden. Durch die subsequenzielle Freigabe von BDHA2OMe **30e** aus der Bindung an den Plasmaproteinen, der langsamen CYP450-katalysierten Demethylierungsreaktionen und des daraus resultierenden nahezu konstanten Plasmakonzentrationsspiegels der Verbindung **30e** lagen auch BAOMe **72** und BA **15** über sechs Stunden in nahezu gleichbleibenden Konzentrationen im murinen Plasma vor. Diese Eigenschaft des Modell-Prodrugs **30e** könnte in Form eines arzneiformunabhängigen Retard-Effektes in Arzneistoffen Anwendung finden, bei denen eine lange Wirkdauer erforderlich ist und Wirkstoffkonzentrationsspitzen unerwünscht sind.

Außerdem wurde der Einfluss von Stickstoff-Substituenten auf die Metabolisierung von *N*-mono- und *N,N*-disubstituierten Benzamidoximen **74** durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem *in vitro* an einigen Beispielverbindungen untersucht. Als Enzymquellen dienten die äußere Mitochondrienmembran von Schweinen (SLOMV) und die rekonstituierten rekombinanten humanen mARC1- und mARC2-Enzymsysteme mit Cytochrom-b5 und Cytochrom-b5-Reduktase. Dabei stellte sich heraus, dass der +I-Effekt von aliphatische Substituenten aktivierend auf die mARC-abhängige Reduktion zum entsprechenden *N*-substituierten Benzamidin **75** wirken. Allerdings führt eine zweifache Substitution des hydroxylaminartigen Stickstoffatoms zu einer sterischen Hinderung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, welche den reaktionsbegünstigenden +I-Effekt übertreffen. Aufgrund dessen ist *N*-Methylbenzamidoxim (**74a**) die einzige getestete Verbindung, welche stärker metabolisiert wird als die Vergleichsverbindung Benzamidoxim (**14**). Das nicht untersuchte *N*-mono-substituierte *N*-Ethylbenzamidoxim könnte folglich ebenfalls im Vergleich zu BAO **14** leichter reduziert werden, wenn der anspruchsvollere sterische Einfluss eine untergeordnete Bedeutung besitzt. Aromatische Stickstoff-Substituenten wirken stark desaktivierend auf die Metabolisierung durch das mARC-System. Dies war auch bei der Umsetzung von *N*-Phenylbenzamidoxim (**74b**) auffällig, obwohl durch die nur einfache Substitution des Stickstoffs eine sterische Hinderung schwächer ausgeprägt gewesen sein sollte. Der Vergleich der zweifach *N*-alkylsubstituierten Benzamidoxime *N,N*-Dimethylbenzamidoxim **74c** und 2-(1-Piperidyl)benzamidoxim **74d** ergab eine leicht bevorzugte Umsetzung von **74d**, bei welchem die Alkylgruppen cyclisiert vorliegen. Unter den Ergebnissen der eingesetzten Proteinquellen ähnelt die OMV stärker dem rhmARC2 als dem rhmARC1. Dies könnte mit dem überwiegenden Vorkommen der mARC2-Isoform bei Schweinen begründet werden, obwohl die Zuordnung von mARC1 und mARC2 zwischen unterschiedlichen Spezies aufgrund hoher genetischer Ähnlichkeiten derzeit nicht eindeutig bestimmbar ist. Die gewonnenen Erkenntnisse können Berücksichtigung in der Entwicklung von amidinhaltigen Arzneistoffen finden. So kann eine Methylsubstitution des aminartigen Stickstoffatoms die Aktivierung eines Amidoxim-Prodrugs verstärken und sterisch anspruchsvolle Reste die Reduktion verlangsamen.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Synthesen

7.1.1 Geräte und Materialien

Elementaranalysen

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CHNS-Analysator der Firma HEKAtech GmbH).

IR-Spektroskopie

Für die Aufnahme der ATR-IR-Spektren wurde das Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR Gerät mit universal ATR-Zusatz verwendet.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer Bruker Avance III, 300, Bruker Topspin 2.1 Software, 298 K

^1H -NMR: Messfrequenz = 300.1 MHz

^{13}C -NMR: Messfrequenz = 75.5 MHz

^{15}N -NMR: Messfrequenz = 30.4 MHz

^{29}Si -NMR: Messfrequenz = 59.6 MHz

Interne und externe Standards: Bei Verwendung des Lösungsmittels DMSO- d_6 wurden die Spektren auf internes DMSO- d_5 (^1H -NMR δ = 2.5 ppm), internes DMSO- d_6 (^{13}C -NMR δ = 39.5 ppm) und auf den externen Standard Nitromethan in DMSO- d_6 (^{15}N -NMR δ = 381.6 ppm) bezogen. Spektren im Lösungsmittel CDCl_3 wurden auf internes CHCl_3 (^1H -NMR δ = 7.26 ppm, ^{13}C -NMR δ = 77.2 ppm), auf den externen Standard Nitromethan in CDCl_3 (^{15}N -NMR δ = 381.6 ppm) und auf den externen Standard Tetramethylsilan in CDCl_3 (^{29}Si -NMR δ = 0.00 ppm) kalibriert.

Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal, J = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat, C_q = quartäres C-Atom, ds = diastereomerer shift

Massenspektrometrie

Bruker Daltonics Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI)

Die Proben für die Massenspektrometrie wurden mit dem Agilent 1100 HPLC-System mit G1322A Entgaser, der binären Pumpe G1312A, dem Probengeber G1313A ALS und dem Photodiodenarray-

Detektor G1315B DAD bei einer Wellenlänge von 200-600 nm mit der HPLC-Software Chemstation for LD 3D, Rev. A. 09.01 und der MS-Software Bruker Daltonics esquireLC 4.5 mit esquire trap control 6.16 vermessen und mit der Software Bruker DataAnalysis 4.0 ausgewertet.

Methode A: Säule: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8, 125 × 4.6 mM, 5 µm; Eluent A: 5 % Acetonitril, 95 % 0.1 %ige Essigsäure; Eluent B: 100 % Acetonitril; Gradient: 0-1 min (100 % A), 1-10 min (0-90 % B), 10-12.9 min (90 % B), 12.9-13 min (90-0 % B); Flussrate: 1.5 ml/min

Methode B: Direkteinlass als methanolische Lösung

Hochauflösende Massenspektrometrie

Alle Proben wurden mit einem Bruker APEX III FT-ICR Massenspektrometer mit 7.05 T Magneten (Bruker Daltonik, Bremen) am GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung in Kiel aufgenommen. Die Proben wurden in Ethanol gelöst und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol, Wasser und Ameisensäure (49.9/49.9/0.2) auf eine Konzentration von ca. 100 pmol/µl verdünnt. Mit Hilfe einer ESI-Quelle wurden die Proben in die Gasphase gebracht und ins Massenspektrometer überführt. In den Spektren ist jeweils nicht die Masse der neutralen Verbindung M , sondern immer das $[M + H]^+$ als Quasimolekülion zu sehen.

Lipophiliebestimmung

Die $\log D$ -Werte wurden mit einer HPLC-Methode mit Gradientenelution bestimmt. Eine Waters X Terra MS C8 (4.6 × 50 mm, 3.5 µm Partikelgröße) Säule wurde mit einer C8 Phenomenex Vorsäule (3 × 2 mm) verwendet. Das Fließmittel bestand aus den folgenden zwei Mischungen: Fließmittel A (5 % Methanol und 95 % (v/v) 25 mM Ammoniumacetatlösung, pH 7.4) und Fließmittel B (95 % Methanol und 5 % des entsprechenden Puffers). Die Elution erfolgte durch einen Fließmittelgradienten beginnend mit 100 % A, sich linear innerhalb von 50 min mit einer Flussrate von 0.5 ml/min zu 100 % B verändernd. Die Detektion erfolgte bei 220 nm und die Säule wurde auf 30 °C temperiert. Es wurde mit 6 bzw. mit 10 Standards ausgewertet. Die folgenden Referenzen wurden verwendet ($\log P$ -Werte in Klammern)¹⁴⁶: Acetylpyridin (0.5), Acetanilid (1.0), Acetophenon (1.7), Benzoessäuremethylester (2.1), Benzoessäureethylester (2.6), Benzophenon (3.2), Benzoessäurephenylester (3.6), Diphenylether (4.2), Dibenzyl (4.8), Triphenylamin (5.7). Das Totvolumen wurde mit dem Lösungsmittelsignal bestimmt und die berechneten k -Werte wurden linear mit den angegebenen $\log P$ -Werten korreliert.

Schmelzpunkte

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgte unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Fertigplatten Polygram SIL G/UV₂₅₄ 0.2 mM Kieselgel der Firma Macherey-Nagel, Düren verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm.

Sprühreagenzien:

FeCl₃: 2 %ige FeCl₃-Lösung in Wasser

Ninhydrin: 150 mg Ninhydrin, 47.5 ml *i*-Propanol, 2.5 ml Eisessig

Ehrlich-Reagenz: 2 %ige *N,N*-Dimethylaminobenzaldehydlösung in 20 %iger Salzsäure

Präparative Chromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Syntheseprodukte erfolgte über Kieselgel G₆₀, 0.063-0.2 mm der Firma Macherey-Nagel, Düren.

Die Flashchromatographie wurde mit Interchim Puriflash Silica HP 30 µm 12 g Flash Column Kartuschen mit der CombiFlash®RETRIEVE durchgeführt.

Chemikalien

Die verwendeten Reagenzien und Ausgangsstoffe wurden von den Firmen ABCR, Acros, Alfa-Aesar, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich, Roth und TCI-Europe bezogen und ohne vorherige Aufreinigung verwendet.

Methanol für die Chromatographie wurde in HPLC-Qualität (Fa. J.T. Baker, Griesheim) eingesetzt.

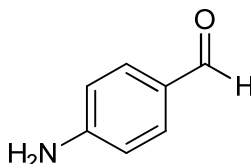
Hydroxylamin (freie Base) wurde nach Steudel und Schenk [1975] durch Ausfrieren nach Neutralisation von Hydroxylaminhydrochlorid mit Natriumethanolat gewonnen.²¹²

7.1.2 Synthesevorschriften

7.1.2.1 Synthese von *para*-substituierten Benzaldehyden

7.1.2.1.1 *p*-Aminobenzaldehyd (16a)

Synthesevorschrift in Anlehnung an Bellamy *et al.* [1984]:^{110,213}



Es werden 1.51 g *p*-Nitrobenzaldehyd (**16h**) (10 mmol) und 11.28 g Zinnchlorid-Dihydrat (50 mmol) in 20 ml Ethanol suspendiert und im Schlenkkolben unter Stickstoffatmosphäre auf 70 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion nach wenigen Minuten wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ansatz wird auf Eis gekippt und mit 20 %iger Natriumhydroxidlösung neutralisiert und filtriert. Nach dreimaliger Extraktion mit Ethylacetat, Waschen der organischen Phase mit demineralisiertem Wasser und NaCl-Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und direkt für die weitere Reaktion eingesetzt (siehe Kapitel 7.1.2.2.4).

Ausbeute: 636 mg gelbes Pulver (53 %) (Lit.: 96 %)¹¹⁰

Schmp.: 78 °C (Lit.: 76-78 °C)²¹³

DC: R_f = 0.12 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; Ninhydrin: gelb)

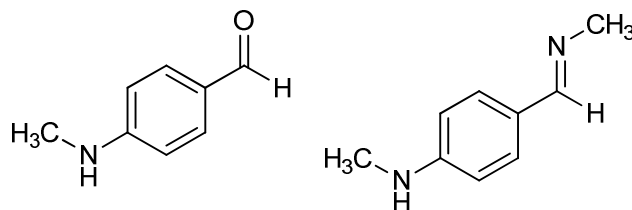
Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹¹⁰

7.1.2.1.2 Synthese von *N*-alkylierten *p*-Aminobenzaldehyden

Synthesevorschrift in Anlehnung an Jiao *et al.* [2011]:¹⁰⁷

3.7 g *p*-Brombenzaldehyd (**16f**) (20 mmol) und 100 mmol 30 %ige wässrige Alkylaminlösung werden in einem dicht verschließbaren Reaktionsgefäß vermischt. 64 mg feines Kupferpulver (1 mmol) werden hinzugegeben und der Ansatz wird für 13 h auf 100 °C unter Rühren im Ölbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird 40 ml Wasser zugegeben mit 40 ml Ethylacetat extrahiert. Nach weiteren 2 Extraktionen mit je 20 ml Ethylacetat werden die organischen Phasen vereinigt, mit NaCl-Lösung und demineralisiertem Wasser gewaschen, anschließend über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Nach Flashchromatographie mit Cyclohexan/Ethylacetat erhält man ein Gemisch aus dem gewollten *p*-Alkylaminobenzaldehyd **16i,k** und dem Nebenprodukt *p*-Alkylaminobenzalkylimin **25i,k**. Beide Produkte reagieren im nächsten Schritt zu *p*-Alkylaminobenzaldoxim **17i,k**, weswegen keine weitere Trennung durchgeführt wird.

7.1.2.1.2.1. *p*-Methylaminobenzaldehyd (**16i**) / *p*-Methylaminobenzmethylimin (**25i**)



Es entstand ein Gemisch aus *p*-Methylaminobenzaldehyd (**16i**) (46 %) und *p*-Methylaminobenzmethylimin (**25i**) (54 %).

Ausbeute: 1.08 g gelbes Öl (40 %) (Lit.: 89 % (**16i**))¹⁰⁷

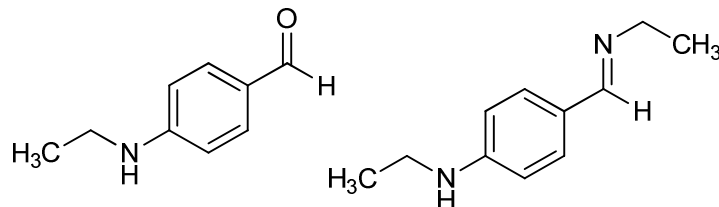
DC: R_f = 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: gelb)

¹H-NMR (*p*-Methylaminobenzmethylimin (**25i**); DMSO-*d*₆): δ/ppm = 2.70 (d, 3 H, (-NH-)CH₃, ³*J* = 5.1 Hz), 3.32 (d, 3 H, (=N)CH₃, ⁴*J* = 1.5 Hz), 6.11 (br q, 1 H, NH, ³*J* = 4.9 Hz), 6.54 (d, 2 H, Ar-H), 7.44 (d, 2 H, Ar-H), 8.08 (br q, 1 H, CH, ⁴*J* = 1.5 Hz).

Die spektroskopischen Daten für *p*-Methylaminobenzaldehyd (**16i**) entsprechen denen der Literatur.¹⁰⁷

MS (ESI): *m/z* = 136 [M + H]⁺, 149 [M + H]⁺.

7.1.2.1.2.2. *p*-Ethylaminobenzaldehyd (**16k**) / *p*-Ethylaminobenzethylimin (**25k**)



Es entstand ein Gemisch aus *p*-Ethylaminobenzaldehyd (**16k**) (59 %) und *p*-Ethylaminobenzethylimin (**25k**) (41 %).

Ausbeute: 221 mg gelbes Öl (7 %)

DC: R_f = 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl₃: gelb)

$^1\text{H-NMR}$ (*p*-Ethylaminobenzethylimin (**25k**); $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 1.17 (m, 6 H, 2 CH_3), 3.07 (q, 2 H, $(-\text{NH}-)\text{CH}_2-$), 3.47 (q, 2 H, $(=\text{N})\text{CH}_2-$), 6.02 (t, 1 H, NH), 6.55 (d, 2 H, Ar-H), 7.43 (d, 2 H, Ar-H), 8.08 (br t, 1 H, CH).

Die spektroskopischen Daten für *p*-Ethylaminobenzaldehyd (**16k**) entsprechen denen der Literatur.²¹⁴

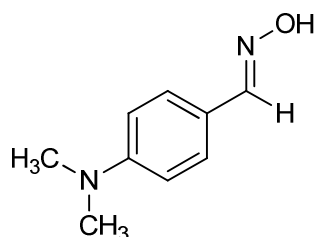
MS (ESI): m/z = 150 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 177 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

7.1.2.2 Synthese von *para*-substituierten Benzaldoximen

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an die Literatur:^{94–97,103,105,215}

4.28 g Hydroxylaminhydrochlorid (1.2 eq, 60 mmol) werden in 40 ml Wasser gelöst und mit 10 %iger Natronlauge oder 60 mmol Kalium- oder Natriumcarbonat neutralisiert. 50 mmol des entsprechenden Aldehyds **16** werden in Methanol oder Ethanol gelöst, langsam unter Kühlung zugetropft und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Evaporation des enthaltenen Methanols bzw. Ethanols wird mit Wasser verdünnt und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit NaCl-Lösung und demineralisiertem Wasser gewaschen, anschließend über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Das Produkt **17** wird ohne weitere Aufreinigung für die folgenden Synthesen eingesetzt.

7.1.2.2.1 *p*-Dimethylaminobenzaldoxim (**17l**)



Ausbeute: 6.56 g gelbes Pulver (88 %) (Lit.: 99 %)¹⁰⁵

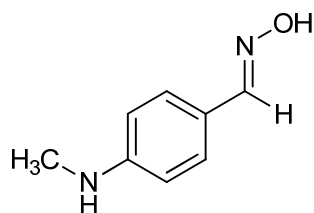
Schmp.: 151 °C (Lit.: 144 °C)¹⁰⁵

DC: R_f = 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.²¹⁶

7.1.2.2.2 *p*-Methylaminobenzaldoxim (**17i**)

Für die Synthese wird ein Gemisch aus *p*-Methylaminobenzaldehyd (**16i**) und *p*-Methylaminobenzmethylimin (**25i**) (siehe Kapitel 7.1.2.1.2.1) eingesetzt und in Anlehnung an die Literatur verfahren.⁹⁶



Ausbeute: 6.82 g oranges Pulver (82 %) (Lit.: 55 %)⁹⁶

Schmp.: 105 °C (Lit.: 97 °C)⁹⁶

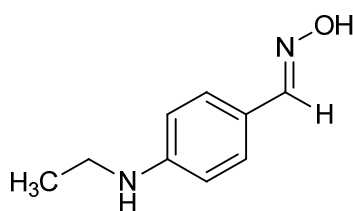
DC: R_f = 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.²¹⁷

MS (ESI): m/z = 151 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 136, 134.

7.1.2.2.3 *p*-Ethylaminobenzaldoxim (17k)

Für die Synthese wird ein Gemisch aus *p*-Ethylaminobenzaldehyd (**16k**) und *p*-Ethylaminobenzethylimin (**25k**) (siehe 7.1.2.1.2.2) eingesetzt und in Anlehnung an die Literatur verfahren.⁹⁶



Ausbeute: 6.48 g oranger Feststoff (79 %)

Schmp.: 121 °C

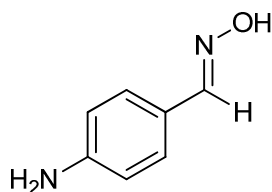
DC: R_f = 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : braun)

^1H -NMR (CDCl_3): δ/ppm = 1.15 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 3.03-3.06 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 5.90 (br t, 1 H, NH), 6.53 (d, 2 H, Ar-H), 7.29 (d, 2 H, Ar-H), 7.90 (s, 1 H, CH), 10.54 (s, 1 H, OH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ/ppm = 14.3 (CH_3), 37.1 (CH_2), 111.7 (Ar-CH), 120.1 (Ar- C_q), 127.6 (Ar-CH), 148.3 ($\text{C}=\text{N}$), 149.9 (Ar- C_q).

MS (ESI): m/z = 165 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 148, 136.

7.1.2.2.4 *p*-Aminobenzaldoxim (17a)

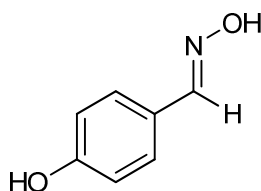


Ausbeute: 2.45 g gelbes Pulver (36 %) (Lit.: 66 %)²¹⁸

Schmp.: 126 °C (Lit.: 127-129 °C)²¹⁸

DC: R_f = 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.²¹⁷

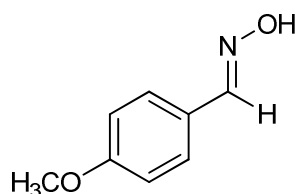
7.1.2.2.5 *p*-Hydroxybenzaldoxim (17b)

Ausbeute: 6.66 g weißes Pulver (97 %) (Lit.: 94 %)⁹⁵

Schmp.: 112 °C (Lit.: 112 °C)⁹⁴

DC: $R_f = 0.24$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²¹⁹

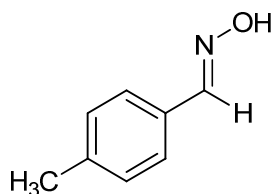
7.1.2.2.6 *p*-Methoxybenzaldoxim (17c)

Ausbeute: 7.43 g weißer Feststoff (98 %) (Lit.: 96 %)¹⁰³

Schmp.: 71 °C (Lit.: 68-70 °C)²²⁰

DC: $R_f = 0.45$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁰³

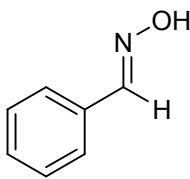
7.1.2.2.7 *p*-Methylbenzaldoxim (17d)

Ausbeute: 6.59 g weißes Pulver (98 %) (Lit.: 97 %)¹⁰³

Schmp.: 74 °C (Lit.: 110 °C¹⁰³, 74-75 °C¹⁰⁵)

DC: $R_f = 0.55$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

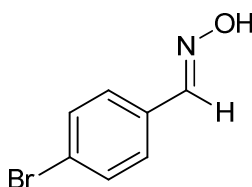
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁰³

7.1.2.2.8 Benzaldoxim (17e)

Ausbeute: 6.06 g klares Öl (100 %) (Lit.: 95 %) ¹⁰³

DC: $R_f = 0.43$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ¹⁶⁸

7.1.2.2.9 *p*-Brombenzaldoxim (17f)

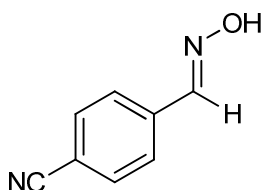
Ausbeute: 6.91 g weißer Feststoff (84 %) (Lit.: 93 %) ⁹⁷

Schmp.: 116 °C (Lit.: 112 °C) ²²¹

DC: $R_f = 0.49$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ⁹⁷

MS (ESI): $m/z = 200/202$ [M + H]⁺.

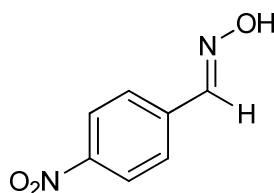
7.1.2.2.10 *p*-Cyanobenzaldoxim (17g)

Ausbeute: 7.07 g weißer Feststoff (97 %)

Schmp.: 178 °C (Lit.: 174 °C) ²²¹

DC: $R_f = 0.25$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ²²²

7.1.2.2.11 *p*-Nitrobenzaldoxim (17h)

Ausbeute: 8.13 g gelbes Pulver (98 %) (Lit.: 95 %)⁹⁵

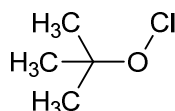
Schmp.: 134 °C (Lit.: 128 °C)²²¹

DC: R_f = 0.55 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁹⁵

7.1.2.3 *N*-tert-Butyl-*N*-chlorcyanamid

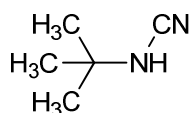
Die für die Darstellung der Verbindung (siehe 7.1.2.3.3) benötigten Reagenzien **21** und **23** müssen zunächst synthetisiert werden (siehe 7.1.2.3.1 und 7.1.2.3.2).¹⁰²

7.1.2.3.1 Synthese von *tert*-Butylhypochlorit (21**)**

Für das benötigte *tert*-Butylhypochlorit (**21**) wird in Anlehnung an die Literatur verfahren:²²³

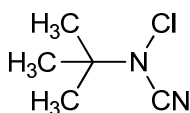
Es werden 250 ml 5 %ige Natriumhypochloritlösung in einen Kolben gegeben und unter Rühren im Eisbad auf unter 10 °C abgekühlt. Unter Lichtausschluss durch Alufolie wird eine Mischung aus 20.5 ml *tert*-Butylalkohol (**20**) und 12.25 ml Eisessig schnell in einer Portion zugegeben. Nach weiteren 3 Minuten Rühren wird das Gemisch in einen Scheidetrichter gegeben, die organische Phase abgetrennt, mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und anschließend mit Wasser gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet.

Ausbeute: 12.0 g gelbes Öl (51 %) (Lit.: 66 %)²²³

7.1.2.3.2 Synthese von *N*-tert-Butyl-*N*-cyanamid (23**)**

Eine Lösung aus 14.85 g Bromcyan (0.19 mol) in 175 ml Diethylether wird auf 0 °C abgekühlt. 10.2 g *N*-tert-Butylamin (**22**) (1 eq) werden in 100 ml Diethylether gelöst und langsam zu der gekühlten Bromcyanlösung getropft. Bei gleichbleibender Temperatur wird 45 Minuten gerührt. Der entstandene weiße Niederschlag wird abfiltriert und das etherische Filtrat zweimal mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wird zur Hälfte einrotiert und ohne weitere Aufreinigung für die nächste Reaktion verwendet.

7.1.2.3.3 Synthese von *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (**24**)



Die etherische *N*-*tert*-Butyl-*N*-cyanamidlösung **23** wird mit 37.5 ml Chloroform verdünnt und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. 20.6 g *tert*-Butylhypochlorit (**21**) (1 eq) wird in 15 ml Chloroform gelöst und hinzugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Lösung erwärmt sich auf Raumtemperatur. Nach Evaporieren des Solvens der entstandenen gelbe Lösung wird fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 9.44 g gelbes Öl (38 %)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹⁰²

7.1.2.4 Synthese von *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechloriden

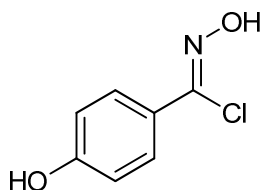
Methode A: Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Liu *et al.* [1980].⁹⁸

Es werden 40 mmol des bereits synthetisierten *para*-substituierten Benzaldoxims **17** unter Rühren in 60 ml Dimethylformamid gelöst. Dazu werden 40 mmol *N*-Chlorsuccinimid (**26**) in zwei Portionen zugegeben und die Lösung auf 40 °C gebracht, sofern sie sich nicht spontan erwärmt. Zum Reaktionsstart wird wenig HCl-Gas eingeleitet. Die Lösung rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend werden 60 ml Eiswasser auf den Ansatz gekippt und das Gemisch zweimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird dreimal mit Eiswasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Das Produkt **18** liegt für die weiteren Umsetzungen in ausreichender Reinheit vor.

Methode B: Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Kumar *et al.* [2006].¹⁰¹

5 mmol des entsprechenden *para*-substituierten Benzaldoxims **17** werden in 15 ml trockenem Dichlormethan im Schlenkkolben gelöst. Es wird mit Stickstoff begast und tropfenweise eine Lösung aus 616 µl (5 mmol) *N*-*tert*-Butyl-*N*-chlorcyanamid (CBCA, **24**) in 10 ml trockenem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktion ist nach wenigen Minuten beendet. Das Reaktionsgemisch kann direkt für weitere Reaktionen eingesetzt werden. Die eventuelle Aufreinigung zur Charakterisierung des Zwischenproduktes **18** erfolgt mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit der mobilen Phase bestehend aus Cyclohexan und Ethylacetat in einer Gradienten-Methode.

7.1.2.4.1 *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**)



Die Verbindung wird nach Methode A hergestellt.

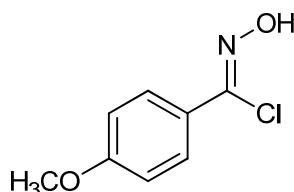
Ausbeute: 6.86 g beiger Feststoff (97 %) (Lit.: 98 %)²²⁴

Schmp.: 125 °C

DC: $R_f = 0.05$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : dunkelbraun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁴

7.1.2.4.2 *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (18c)



Die Verbindung kann sowohl nach Methode A als auch nach Methode B hergestellt werden.

Ausbeute: Methode A: 7.35 g hellgelber Feststoff (99 %) (Lit.: 97 %)⁹⁵

Methode B: Vollständige Umsetzung laut DC. Die Verbindung wird ohne weitere Aufreinigung und Isolation für nachfolgende Reaktionen eingesetzt.

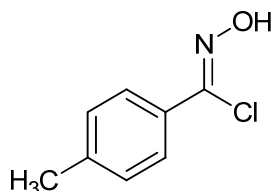
Schmp.: 85 °C (Lit.: 89 °C)¹⁰⁵

DC: $R_f = 0.66$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : dunkelbraun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁹⁵

MS (ESI): $m/z = 186/188$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

7.1.2.4.3 *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (18d)



Die Verbindung kann sowohl nach Methode A als auch nach Methode B hergestellt werden.

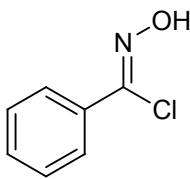
Ausbeute: Methode A: 6.82 g weißer Feststoff (100 %) (Lit.: 95 %)²¹⁵

Methode B: Vollständige Umsetzung laut DC. Die Verbindung wird ohne weitere Aufreinigung und Isolation für nachfolgende Reaktionen eingesetzt.

Schmp.: 68 °C (Lit.: 71.5-72.5 °C)¹⁰⁵

DC: $R_f = 0.65$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{105,224}

7.1.2.4.4 Benzhydroxamsäurechlorid (18e)

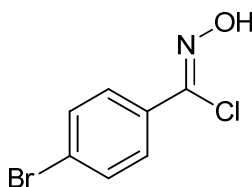
Die Verbindung wird nach Methode A hergestellt.

Ausbeute: 6.22 g weißer Feststoff (100 %) (Lit.: 98 %)⁹⁵

Schmp.: 47 °C (Lit.: 50 °C)¹⁰⁵

DC: R_f = 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁹⁵

7.1.2.4.5 *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (18f)

Die Verbindung kann sowohl nach Methode A als auch nach Methode B hergestellt werden.

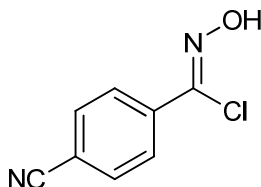
Ausbeute: Methode A: 9.38 g hellgelber Feststoff (100 %) (Lit.: 100 %)⁹⁹

Methode B: Vollständige Umsetzung laut DC. Die Verbindung wird ohne weitere Aufreinigung und Isolation für nachfolgende Reaktionen eingesetzt.

Schmp.: 80 °C (Lit.: 76 °C)²²⁵

DC: R_f = 0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁵

7.1.2.4.6 *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (18g)

Die Verbindung wird nach Methode A hergestellt.

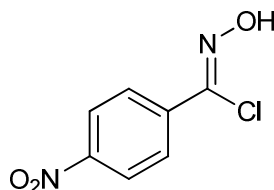
Ausbeute: 6.86 g weißes Pulver (95 %) (Lit.: 100 %)⁶⁰

Schmp.: 145 °C (Lit.: 151-152 °C¹⁰⁵, 146-148 °C⁶⁰)

DC: R_f = 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁶⁰

7.1.2.4.7 *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**)



Die Verbindung wird nach Methode A hergestellt.

Ausbeute: 7.46 g hellgelbes Pulver (93 %) (Lit.: 97 %)⁹⁵

Schmp.: 126 °C (Lit.: 123-124 °C)²²⁶

DC: $R_f = 0.55$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : braun)

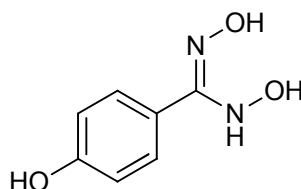
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁹⁵

7.1.2.5 Synthese von *para*-substituierten *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Ley *et al.* [1898]:⁷¹

3 mmol des entsprechenden *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechlorids **18** werden in 5-10 ml Diethylether gelöst und in einen Tropftrichter gegeben. 9 mmol Hydroxylamin als freie Base (3 eq) werden unter Rühren im Kolben in Ethanol gelöst und im Eisbad abgekühlt. Die Hydroxamsäurechloridlösung **18** wird langsam unter Rühren hinzugetropft. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC verfolgt (Cyclohexan/Ethylacetat; FeCl_3 -Sprühreagenz: blau ohne Hitze). Ist nach 7 h noch Ausgangsstoff **18** detektierbar, werden weitere zwei Äquivalente Hydroxylamin, gelöst in Ethanol, hinzugegeben. Nach Beendigung der Reaktion nach 5-20 h wird das Fällungsprodukt abfiltriert, das Filtrat eingeeengt und für die Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **9** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.5.1 *p*-Hydroxy-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9b**)



Es werden 3 mmol *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) (515 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung mit Dichlormethan angerieben und abfiltriert. Das reine Produkt **9b** verbleibt als feines Pulver im Rückstand.

Ausbeute: 165 mg beiger Feststoff (33 %)¹⁵⁸

Schmp.: 112 °C

DC: $R_f = 0.13$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : blau)

$\log D$: 0.2 (ber. $\log D = 0.62$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3290, 3195, 2508, 1598, 1270, 1026, 831.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 6.74 (d, 2 H, Ar-H), 7.39 (d, 2 H, Ar-H), 8.08 (s, 1 H, NH), 8.30 (2, 1 H, (NHO)H), 9.58 (s, 1 H, *p*-OH), 10.09 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 114.5 (Ar-C-3), 122.7 (Ar-C-1), 129.1 (Ar-C-2), 156.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 158.0 (Ar-C-4).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 128.2 (NH), 297.0 (=NOH).

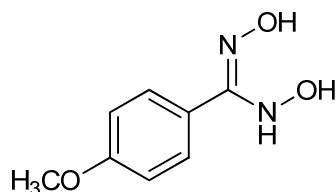
MS (ESI): m/z = 169 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 152 $[\text{M} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$, 134 $[\text{M} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, 120 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.1\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ (176.96)

Ber. C 50.23 H 5.01 N 15.83

Gef. C 50.00 H 4.78 N 15.80

7.1.2.5.2 *p*-Methoxy-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (9c)



Es werden 5 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (928 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung mit Dichlormethan angerieben und abfiltriert. Das reine Produkt **9c** verbleibt als feines Pulver im Rückstand.

Ausbeute: 373 mg weißer Feststoff (41 %)¹⁵⁸

Schmp.: 118 °C

DC: $R_f = 0.28$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : blau)

$\log D$: 0.5 (ber. $\log D = 0.78$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3313, 3076, 2973, 2710, 2554, 1607, 1249, 833.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 3.77 (s, 3 H, *p*-OCH₃), 6.92 (d, 2 H, Ar-H), 7.52 (d, 2 H, Ar-H), 8.13 (s, 1 H, NH), 8.40 (s, 1 H, (NHO)H), 10.20 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 55.1 (*p*-OCH₃), 113.2 (Ar-C-3), 124.3 (Ar-C-1), 129.1 (Ar-C-2), 156.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 159.7 (Ar-C-4).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 128.2 (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 82$ Hz), 298.3 (=NOH).

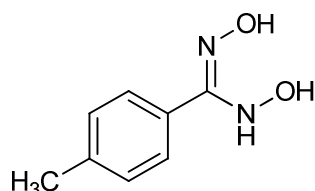
MS (ESI): $m/z = 183$ $[M + H]^+$, 166 $[M - NH_3 + H]^+$, 148 $[M - NH_3 - H_2O + H]^+$, 134 $[M - CH_3NH_2 - H_2O + H]^+$.

$C_8H_{10}N_2O_3$ (182.18)

Ber. C 52.74 H 5.53 N 15.38

Gef. C 52.88 H 5.60 N 15.22

7.1.2.5.3 *p*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9d**)



Es werden 2 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (339 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung mit Dichlormethan angerieben und abfiltriert. Das reine Produkt **9d** verbleibt als feines Pulver im Rückstand.

Ausbeute: 238 mg weißer Feststoff (72 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 124 °C

DC: $R_f = 0.13$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; $FeCl_3$: blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3351, 3042, 2919, 2776, 1622, 1339, 944, 822.

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 2.31$ (s, 3 H, *p*-CH₃), 7.17 (d, 2 H, Ar-H), 7.47 (d, 2 H, Ar-H), 8.16 (s, 1 H, NH), 8.37 (s, 1 H, (NHO)H), 10.26 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 20.9$ (*p*-CH₃), 127.6 (Ar-C-2), 128.3 (Ar-C-3), 129.2 (Ar-C-1), 138.1 (Ar-C-4), 156.9 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 128.3$ (NH, $^1J_{N,H} = 83$ Hz), 299.2 (=NOH).

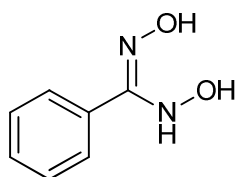
MS (ESI): $m/z = 167$ $[M + H]^+$, 150 $[M - NH_3 + H]^+$, 132 $[M - NH_3 - H_2O + H]^+$, 118 $[M - CH_3NH_2 - H_2O + H]^+$.

$C_8H_{10}N_2O_2 \cdot 0.1C_6H_{12}$ (174.60)

Ber. C 59.16 H 6.47 N 16.04

Gef. C 59.10 H 6.16 N 16.06

7.1.2.5.4 *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**)



Es werden 5 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (778 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung in wenig Ethylacetat gelöst und mit Petrolether zur Fällung gebracht. Nach Kühlung über Nacht wird das feine weiße Pulver **9e** durch Absaugen erhalten.

Ausbeute: 324 mg weißer Feststoff (43 %)¹⁵⁸

Schmp.: 115 °C (Lit.: 119,8⁸⁰, 112-113⁷¹)

DC: $R_f = 0.31$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl₃: blau)

log*D*: 0.3 (ber. log*D* = 0.94)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3342, 3285, 3058, 2693, 1626, 1355, 1066, 952.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.40 (m, 3 H, Ar-H), 7.58 (m, 2 H, Ar-H), 8.22 (s, 1 H, NH), 8.40 (s, 1 H, (NHO)H), 10.36 (s, 1 H, (=NO)H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 127.8 (Ar-C-2), 127.8 (Ar-C-3), 128.8 (Ar-C-4), 132.2 (Ar-C-1), 157.0 (C_q(NN)).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 128.3 (NH, ¹*J*_{N,H} = 84 Hz), 300.2 (=NOH).

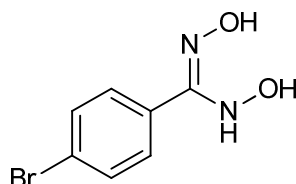
MS (ESI): m/z = 153 [M + H]⁺, 136 [M - NH₃ + H]⁺, 118 [M - NH₃ - H₂O + H]⁺, 104 [M - CH₃NH₂ - H₂O + H]⁺.

C₇H₈N₂O₂ (152.15)

Ber. C 55.26 H 5.30 N 18.41

Gef. C 55.49 H 5.16 N 18.52

7.1.2.5.5 *p*-Brom-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9f**)



Es werden 2.9 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (680 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung mit Dichlormethan angerieben und abfiltriert. Das reine Produkt verbleibt als feines Pulver **9f** im Rückstand.

Ausbeute: 320 mg weißer Feststoff (48 %)¹⁵⁸

Schmp.: 117 °C

DC: $R_f = 0.12$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

log*D*: 1.0 (ber. log*D* = 1.64)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3342, 3267, 3083, 2770, 1626, 1352, 1070, 948, 827.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 7.50 (d, 2 H, Ar-H), 7.57 (d, 2 H, Ar-H), 8.27 (s, 1 H, NH), 8.43 (s, 1 H, (NHO)H), 10.45 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 122.0 (Ar-C-4), 129.7 (Ar-C-2), 130.7 (Ar-C-3), 131.3 (Ar-C-1), 155.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

$^{15}\text{N-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 128.3 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 84 Hz), 301.6 (=NOH).

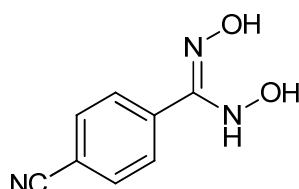
MS (ESI): m/z = 231/233 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 214/216 [$\text{M} - \text{NH}_3 + \text{H}$] $^+$, 196/198 [$\text{M} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$, 182/184 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$ (231.05)

Ber. C 36.39 H 3.05 N 12.12

Gef. C 36.64 H 3.05 N 12.04

7.1.2.5.6 *p*-Cyano-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (9g)



Es werden 2 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (361 mg) eingesetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung mit Dichlormethan angerieben und abfiltriert. Das reine Produkt **9g** verbleibt als feines Pulver im Rückstand.

Ausbeute: 100 mg weißer Feststoff (28 %)¹⁵⁸

Schmp.: 119 °C

DC: R_f = 0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : blau)

log*D*: 0.3 (ber. log*D* = 0.71)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3100, 3049, 2232, 1696, 1281, 1018, 845.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 7.73 (d, 2 H, Ar-H), 7.84 (d, 2 H, Ar-H), 8.40 (s, 1 H, NH), 8.52 (s, 1 H, (NHO)H), 10.71 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 111.2 (Ar-C-4), 118.7 (*p*-CN), 128.4 (Ar-C-2), 131.8 (Ar-C-3), 136.8 (Ar-C-1), 155.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

$^{15}\text{N-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 128.4 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 84 Hz), 305.7 (=NOH).

MS (ESI): m/z = 178 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 161 [$\text{M} - \text{NH}_3 + \text{H}$] $^+$, 143 [$\text{M} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$, 129 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 0.6 \text{ C}_6\text{H}_{12} \cdot 0.1 \text{ C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ (236.47)

Ber. C 61.16 H 6.39 N 17.77

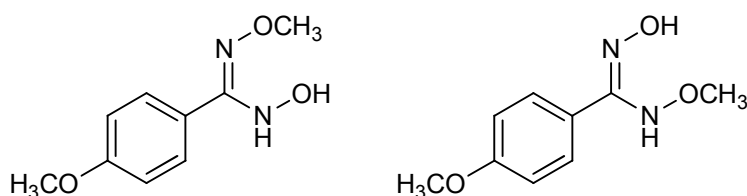
Gef. C 61.16 H 2.88 N 17.46

7.1.2.6 Synthese von *para*-substituierten *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift:¹⁵⁸

Zu dem in Dichlormethan oder Diethylether gelösten *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechlorid **18** werden unter Rühren nacheinander zwei Äquivalente *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und zwei Äquivalente Triethylamin hinzugegeben. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur und das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 2 %ige FeCl₃-Lösung als Sprühreagenz verfärbt das Produkt **31/31'** kurzzeitig blau) verfolgt. Nach 20-25 h wird die Reaktion gestoppt und das Fällungsprodukt abfiltriert. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingeeengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **31/31'** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.6.1 *p*-Methoxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'c**)



Es werden 4 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (742 mg), gelöst in 15 ml Diethylether, eingesetzt. *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin werden in Ethanol vorgelöst und hinzugeotropft. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **31/31'c** mit Cyclohexan angerieben und gelöste Verunreinigungen abfiltriert. *p*-Methoxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'c**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 49:51. Die Verbindung **31/31'c** ist instabil im NMR-Lösungsmittel DMSO-*d*₆ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 156 mg weißer Feststoff (24 %)¹⁵⁸

Schmp.: 95 °C

DC: R_f = 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl₃: kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3292, 3170, 2937, 2839, 1602, 1251, 1025, 819.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Methoxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31c**): δ /ppm = 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (s, 3 H, *p*-OCH₃), 6.93 (m, 2 H, Ar-H), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 8.40 (s, 1 H, NH), 8.48 (s, 1 H, (NHO)H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Methoxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31c**): δ /ppm = 55.1 (*p*-OCH₃), 61.0 (=NOCH₃), 113.2-113.4 (Ar-C-3), 123.2 (Ar-C-1), 128.7-129.5 (Ar-C-2), 156.6 (C_q(NN)), 159.9 (Ar-C-4).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Methoxy-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31c**): δ /ppm = 130.7 (NH, ¹J_{N,H} = 87 Hz), 311.5 (=NOCH₃).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'c**): δ/ppm = 3.45 (s, 3 H, OCH_3), 3.77 (s, 3 H, *p*- OCH_3), 6.93 (m, 2 H, Ar-H), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 8.92 (s, 1 H, NH), 10.39 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'c**): δ/ppm = 55.1 (*p*- OCH_3), 62.4 (NHOCH_3), 113.2-113.4 (Ar-C-3), 123.9 (Ar-C-1), 128.7-129.5 (Ar-C-2), 154.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 159.9 (Ar-C-4).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'c**): δ/ppm = 158.4 (NH).

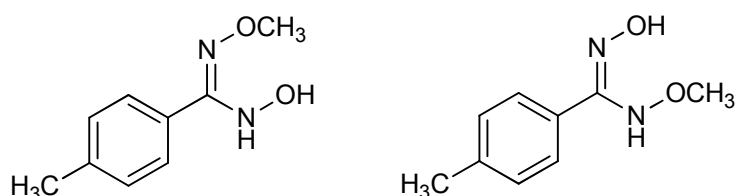
MS (ESI): m/z = 197 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 166 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}]^+$, 134 $[\text{M} - \text{CH}_2=\text{NOH} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.05 \text{ C}_6\text{H}_{12}$ (200.42)

Ber. C 55.74 H 6.34 N 13.98

Gef. C 55.98 H 5.99 N 13.55

7.1.2.6.2 *p*-Methyl-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'd**)



Es werden 2 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (339 mg), gelöst in 5 ml Diethylether, eingesetzt. *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin werden in Ethanol vorgelöst und hinzuge tropft. Die Verbindung **31/31'd** liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 49:51. Die Verbindung **31/31'd** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO-}d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 67 mg weißer Feststoff (19 %)¹⁵⁸

Schmp.: 86 °C

DC: R_f = 0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3330, 3207, 3062, 2974, 2935, 1640, 1350, 921, 811.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31d**): δ/ppm = 2.32 (s, 3 H, *p*- CH_3), 3.74 (s, 3 H, OCH_3), 7.19 (m, 2 H, Ar-H), 7.43 (m, 2 H, Ar-H), 8.43 (s, 1 H, NH), 8.48 (s, 1 H, (NHO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31d**): δ/ppm = 20.8 (*p*- CH_3), 61.0 ($=\text{NOCH}_3$), 127.3-128.0 (Ar-C-2), 128.1 (Ar-C-1), 128.3-128.5 (Ar-C-3), 138.5 (Ar-C-4), 157.0 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31d**): δ/ppm = 131.1 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz), 312.6 ($=\text{NOCH}_3$).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'd**): δ/ppm = 2.32 (s, 3 H, *p*-CH₃), 3.46 (s, 3 H, OCH₃), 7.19 (m, 2 H, Ar-H), 7.43 (m, 2 H, Ar-H), 8.96 (s, 1 H, NH), 10.47 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'd**): δ/ppm = 20.8 (*p*-CH₃), 62.5 (NHOCH₃), 127.3-128.0 (Ar-C-2), 128.3-128.5 (Ar-C-3), 129.0 (Ar-C-1), 138.5 (Ar-C-4), 154.8 (C_q(NN)).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'd**): δ/ppm = 158.4 (NH).

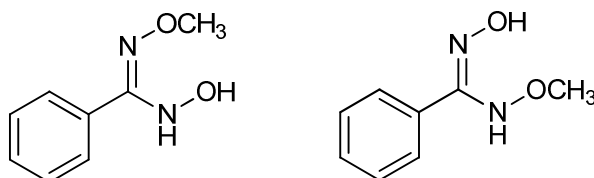
MS (ESI): m/z = 181 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 150 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}$]⁺, 118 [$\text{M} - \text{CH}_2=\text{NOH} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$]⁺.

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.05 \text{ C}_6\text{H}_{12}$ (184.42)

Ber. C 60.57 H 6.89 N 15.19

Gef. C 60.54 H 6.56 N 15.30

7.1.2.6.3 *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'e**)



Es werden 2 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (311 mg), gelöst in 5 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben. Die Verbindung **31/31'e** liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 46:54. Die Verbindung **31/31'e** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO-}d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 127 mg weißer Feststoff (38 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 105 °C

DC: R_f = 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3330, 3199, 3068, 2978, 2940, 1644, 1356, 1073, 917.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31e**): δ/ppm = 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 7.39 (m, 3 H, Ar-H), 7.53 (m, 2 H, Ar-H), 8.49 (s, 1 H, NH), 8.50 (s, 1 H, (NHO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31e**): δ/ppm = 61.1 (=NOCH₃), 127.4-127.7 (Ar-C-2), 127.9-128.1 (Ar-C-3), 129.0 (Ar-C-4), 131.2 (Ar-C-1), 157.1 (C_q(NN)).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31e**): δ/ppm = 131.1 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 88 Hz), 312.2 (=NOCH₃).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *O'*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'e**): δ/ppm = 3.47 (s, 3 H, OCH₃), 7.39 (m, 3 H, Ar-H), 7.53 (m, 2 H, Ar-H), 9.02 (s, 1 H, NH), 10.55 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) von *O*'-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'e**): δ/ppm = 62.5 (NHOCH₃), 127.4-127.7 (Ar-C-2), 127.9-128.1 (Ar-C-3), 129.0 (Ar-C-4), 131.8 (Ar-C-1), 154.9 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6) von *O*'-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'e**): δ/ppm = 158.4 (NH).

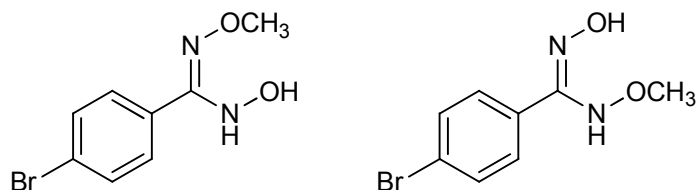
MS (ESI): m/z = 167 [M + H]⁺, 136 [M - CH₃NH₂ + H]⁺, 104 [M - CH₂=NOH - H₂O + H]⁺.

C₈H₁₀N₂O₂·0.05 C₆H₁₂ (170.39)

Ber. C 58.51 H 6.27 N 16.44

Gef. C 58.40 H 6.01 N 16.82

7.1.2.6.4 *p*-Brom-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'f**)



Es werden 2 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (469 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben. Die Verbindung **31/31'f** liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 48:52. Die Verbindung **31/31'f** ist instabil im NMR-Lösungsmittel DMSO- d_6 und zersetzt sich während der Messung teilweise. Außerdem ist die Löslichkeit in DMSO sehr schlecht, wodurch die Möglichkeit der Detektion der NMR-Signale sehr begrenzt ist.

Ausbeute: 352 mg weißer Feststoff (72 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 73 °C

DC: R_f = 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3323, 3156, 2936, 1608, 1593, 1490, 1405, 1069, 1042, 1011, 918, 801.

^1H -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31f**): δ/ppm = 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 7.59 (m, 2 H, Ar-H), 8.56 (s, 1 H, (NHO)H), 8.59 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31f**): δ/ppm = 61.2 (=NOCH₃), 122.4 (Ar-C-4), 129.4-130.1 (Ar-C-2), 130.4 (Ar-C-1), 130.7-131.0 (Ar-C-3), 156.1 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31f**): δ/ppm = 130.6 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 88 Hz), 313.2 (=NOCH₃).

^1H -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*'-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'f**): δ/ppm = 3.46 (s, 3 H, OCH₃), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 7.59 (m, 2 H, Ar-H), 9.08 (s, 1 H, NH), 10.66 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*'-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'f**): δ/ppm = 62.5 (NHOCH₃), 122.3 (Ar-C-4), 129.4-130.1 (Ar-C-2), 130.7-131.0 (Ar-C-3), 131.2 (Ar-C-1), 153.9 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Brom-*O*'-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'f**): $\delta/\text{ppm} = 158.4$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 82$ Hz).

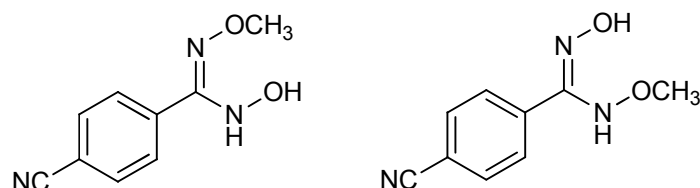
MS (ESI): $m/z = 245/247$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, $214/216$ $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}]^+$, $182/184$ $[\text{M} - \text{CH}_2=\text{NOH} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{Br} \cdot 0.1 \text{CH}_2\text{Cl}_2 \cdot 0.1 \text{C}_6\text{H}_{12}$ (262.70)

Ber. C 40.23 H 4.07 N 10.66

Gef. C 40.45 H 3.24 N 10.70

7.1.2.6.5 *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'g**)



Es werden 3 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (469 mg), gelöst in 15 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **31/31'g** mit zuerst mit Dichlormethan, dann mit Cyclohexan angerieben und gelöste Verunreinigungen abfiltriert. *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31/31'g**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 48:52. Die Verbindung ist instabil im NMR-Lösungsmittel DMSO- d_6 und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 257 mg weißer Feststoff (45 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 134 °C

DC: $R_f = 0.21$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3304, 3151, 2861, 2231, 1608, 1039, 852.

^1H -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31g**): $\delta/\text{ppm} = 3.78$ (s, 3 H, OCH_3), 7.70 (m, 2 H, Ar-H), 7.86 (m, 2 H, Ar-H), 8.66 (s, 1 H, (NHO)H), 8.74 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31g**): $\delta/\text{ppm} = 61.5$ ($=\text{NOCH}_3$), 111.6 (Ar-C-4), 118.6 (*p*-CN), 128.1-128.9 (Ar-C-2), 131.8-132.0 (Ar-C-3), 135.9 (Ar-C-1), 155.7 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31g**): $\delta/\text{ppm} = 131.2$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 88$ Hz), 316.4 ($=\text{NOCH}_3$).

^1H -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O*'-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'g**): $\delta/\text{ppm} = 3.48$ (s, 3 H, OCH_3), 7.70 (m, 2 H, Ar-H), 7.86 (m, 2 H, Ar-H), 9.21 (s, 1 H, NH), 10.95 (s, 1 H, $(=\text{NO})\text{H}$).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O*'-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'g**): $\delta/\text{ppm} = 62.6$ (NHOCH_3), 111.6 (Ar-C-4), 118.6 (*p*-CN), 128.1-128.9 (Ar-C-2), 131.8-132.0 (Ar-C-3), 136.9 (Ar-C-1), 153.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6) von *p*-Cyano-*O'*-methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**31'g**): δ/ppm = 158.1 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 82 Hz), 309.5 (=NOH).

MS (ESI): m/z = 192 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 161 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}]^+$, 129 $[\text{M} - \text{CH}_2=\text{NOH} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ (191.19)

Ber. C 56.54 H 4.74 N 21.98

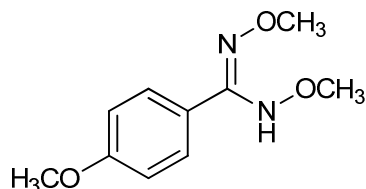
Gef. C 56.59 H 4.70 N 22.33

7.1.2.7 Synthese von *para*-substituierten *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift:¹⁵⁸

Zu dem unter Rühren in Dichlormethan gelösten *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechlorid **18** werden unter Rühren nacheinander zwei Äquivalente *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und zwei Äquivalente Triethylamin hinzugegeben. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur und das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 2 %ige FeCl_3 -Lösung als Sprühreagenz verfärbt das Produkt gelb) verfolgt. Nach 24 h werden weitere zwei Äquivalente *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und zwei Äquivalente Triethylamin hinzugegeben, wenn mittels DC noch *para*-substituiertes Benzhydroxamsäurechlorid **18** nachgewiesen wird. Ebenso wird nach 48 h verfahren. Die Reaktion ist für gewöhnlich nach 48-72 h beendet und das Fällungsprodukt wird abfiltriert. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **30** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.7.1 *p*-Methoxy-*O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30c**)



Es werden 4 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (742 mg), gelöst in 15 ml Diethylether, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin, vorgelöst in Ethanol, unter Rühren hinzugegeben.

Ausbeute: 473 mg farbloses Öl (56 %) ¹⁵⁸

DC: R_f = 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : gelb)

logD: 2.1 (ber. logD = 1.55) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3296, 2938, 2900, 2839, 1607, 1517, 1371, 1248, 1049, 1028, 832.

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 3.43 (s, 3 H, (NHO)CH₃), 3.75 (s, 3 H, (=NO)CH₃), 3.78 (s, 3H, *p*-OCH₃) 6.95 (d, 2 H, Ar-H), 7.43 (d, 2 H, Ar-H), 9.21 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 55.1 (*p*-OCH₃), 61.1 (=NOCH₃), 62.7 (NHOCH₃), 113.4 (Ar-C-3), 122.9 (Ar-C-1), 129.1 (Ar-C-2), 154.7 (C_q(NN)), 160.1 (Ar-C-4).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 160.2 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz), 314.4 (=NOCH₃).

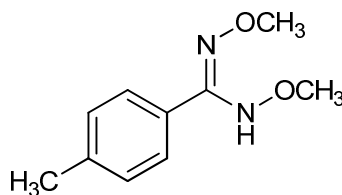
MS (ESI): m/z = 211 [M + H]⁺, 180 [M - CH₃NH₂ + H]⁺, 148 [M - CH₂=NOH - H₂O + H]⁺.

C₁₀H₁₄N₂O₃·0.1 C₆H₁₂ (218.65)

Ber. C 58.23 H 7.01 N 12.81

Gef. C 58.79 H 6.27 N 12.56

7.1.2.7.2 *p*-Methyl-*O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30d)



Es werden 2 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (339 mg), gelöst in 5 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben.

Ausbeute: 83 mg blassgelbes Öl (21 %)¹⁵⁸

DC: R_f = 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl₃: gelb)

log*D*: 2.5 (ber. log*D* = 2.22)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3297, 2939, 2899, 2815, 1606, 1370, 1049, 818.

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 2.33 (s, 3 H, *p*-CH₃), 3.43 (s, 3 H, (NHO)CH₃), 3.76 (s, 3 H, (=NO)CH₃), 7.20 (d, 2 H, Ar-H), 7.39 (d, 2 H, Ar-H), 9.26 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 20.8 (*p*-CH₃), 61.2 (=NOCH₃), 62.7 (NHOCH₃), 127.7 (Ar-C-2), 127.9 (Ar-C-1), 128.5 (Ar-C-3), 138.9 (Ar-C-4), 155.0 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 160.3 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz), 315.3 (=NOCH₃).

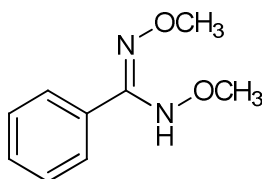
MS (ESI): m/z = 195 [M + H]⁺, 164 [M - CH₃NH₂ + H]⁺, 132 [M - CH₂=NOH - H₂O + H]⁺.

C₁₀H₁₄N₂O₂·0.05 CH₂Cl₂ (198.48)

Ber. C 60.82 H 7.16 N 14.11

Gef. C 60.45 H 6.79 N 14.50

7.1.2.7.3 *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30e)



Es werden 4 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (622 mg), gelöst in 8 ml Diethylether, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin, vorgelöst in Ethanol, unter Rühren hinzugegeben.

Ausbeute: 262 mg gelbes Öl (36 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.59$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 1.8 (ber. $\log D = 1.71$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3295, 3060, 2899, 2816, 1605, 1370, 1048.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 3.44 (s, 3 H, (NHO)CH₃), 3.78 (s, 3 H, (=NO)CH₃), 7.41 (m, 3 H, Ar-H), 7.50 (m, 2 H, Ar-H), 9.33 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 61.3 (=NOCH₃), 62.8 (NHOCH₃), 127.8 (Ar-C-2), 128.0 (Ar-C-3), 129.4 (Ar-C-4), 130.9 (Ar-C-1), 155.1 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 160.4 (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 85$ Hz), 315.8 (=NOCH₃).

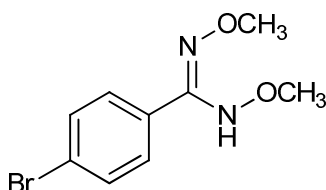
MS (ESI): m/z = 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 150 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}]^+$, 118 $[\text{M} - \text{CH}_2=\text{NOH} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.1 \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (188.70)

Ber. C 57.92 H 6.52 N 14.85

Gef. C 57.99 H 5.67 N 14.78

7.1.2.7.4 *p*-Brom-*O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30f**)



Es werden 2 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (469 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben.

Ausbeute: 62 mg farbloses Öl (13 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.60$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 3.3 (ber. $\log D = 2.48$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3294, 2938, 2899, 2815, 1605, 1593, 1395, 1371, 1048, 823.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 3.44 (s, 3 H, (NHO)CH₃), 3.78 (s, 3 H, (=NO)CH₃), 7.45 (d, 2 H, Ar-H), 7.61 (d, 2 H, Ar-H), 9.40 (s, 1 H, (NHO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 61.3 (=NOCH₃), 62.7 (NHOCH₃), 122.8 (Ar-C-4), 129.8 (Ar-C-2), 130.0 (Ar-C-1), 131.0 (Ar-C-3), 154.1 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 160.3 (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 85$ Hz), 316.4 (=NOCH₃).

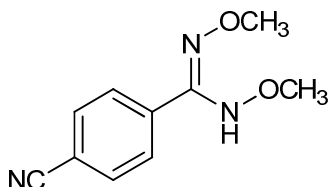
MS (ESI): $m/z = 259/261 [M + H]^+$, $230/228 [M - CH_3NH_2 + H]^+$, $196/198 [M - CH_2=NOH - H_2O + H]^+$.

$C_9H_{11}N_2O_2Br$ (259.11)

Ber. C 41.72 H 4.28 N 10.81

Gef. C 41.86 H 4.00 N 10.60

7.1.2.7.5 *p*-Cyano-*O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30g)



Es werden 2 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (361 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, eingesetzt und *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin unter Rühren hinzugegeben.

Ausbeute: 32 mg weißer Feststoff (8 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 84 °C

DC: $R_f = 0.53$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; $FeCl_3$: gelb)

$\log D$: 1.9 (ber. $\log D = 1.56$) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3266, 3149, 3096, 2939, 2902, 2816, 2230, 1605, 1382, 1056, 844.

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 3.46$ (s, 3 H, (NHO)CH₃), 3.80 (s, 3 H, (=NO)CH₃), 7.67 (d, 2 H, Ar-H), 7.87 (d, 2 H, Ar-H), 9.53 (s, 1 H, (NHO)H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 61.6$ (=NOCH₃), 62.8 (NHOCH₃), 112.0 (Ar-C-4), 118.5 (*p*-CN), 128.6 (Ar-C-2), 132.0 (Ar-C-3), 135.4 (Ar-C-1), 153.7 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): $\delta/ppm = 160.2$ (NH, $^1J_{N,H} = 86$ Hz), 319.3 (=NOCH₃).

MS (ESI): $m/z = 206 [M + H]^+$, 175 [$M - CH_3NH_2 + H$]⁺, 143 [$M - CH_2=NOH - H_2O + H$]⁺, 129 [$M - CH_2=N-O-CH_3 - H_2O + H$]⁺.

$C_{10}H_{11}N_3O_2 \cdot 0.3 C_6H_{12}$ (230.47)

Ber. C 61.50 H 6.39 N 18.23

Gef. C 62.26 H 4.80 N 19.38

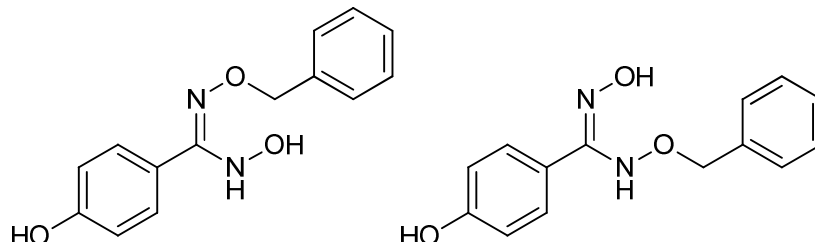
7.1.2.8 Synthese von *para*-substituierten *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift: ¹⁵⁸

Es werden zwei Äquivalente *O*-Benzylhydroxylamin zu einer Lösung aus dem entsprechenden *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechlorid **18** in Dichlormethan, Diethylether oder Dichlormethan/Diethylether gegeben. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur und das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 2 %ige $FeCl_3$ -

Lösung als Sprühreagenz verfärbt das Produkt **10/10'** kurzzeitig blau) verfolgt. Nach 20-25 h wird die Reaktion gestoppt und das Fällungsprodukt abfiltriert. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **10/10'** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.8.1 *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'b**)



Zu 2 mmol *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) (343 mg), gelöst in 15 ml Diethylether/Dichlormethan 1:1, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie wird die reine Verbindung **10/10'b** erhalten. *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'b**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 53:47. Die Verbindung **10/10'b** ist instabil im NMR-Lösungsmittel DMSO-*d*₆ und zersetzt sich während der Messung teilweise. Die Verbindung **10/10'b** ist instabil im reinen Zustand und verändert sich von einem farblosen Öl hin zu einer schwarzen Paste innerhalb von Stunden unter Zersetzung.

Ausbeute: 227 mg farbloses Öl, was sich schnell unter Zersetzung braunschwarz färbt (44 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.44$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl₃: kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3334, 3194, 3031, 2953, 1648, 1606, 1512, 1362, 1231, 1169, 1009, 837.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10b**): δ /ppm = 5.00 (s, 2 H, OCH₂-), 6.77 (m, 2 H, Ar-H), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.36 (m, 2 H, Ar-H), 8.44 (s, 1 H, NH), 8.49 (s, 1 H, (NHO)H), 9.69 (s, 1 H, *p*-OH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10b**): δ /ppm = 74.7 (OCH₂-), 114.6-114.8 (Ar-C-3), 121.7 (Ar-C-1), 127.6-129.0 (Bn-Ar-C), 129.0-129.6 (Ar-C-2), 157.4 (C_q(NN)), 158.4 (Ar-C-4).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Hydroxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10b**): δ /ppm = 130.9 (NH, ¹*J*_{N,H} = 88 Hz), 308.3 (=NOBn).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) von *p*-Hydroxy-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'b**): δ /ppm = 4.70 (s, 2 H, OCH₂-), 6.77 (m, 2 H, Ar-H), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.36 (m, 2 H, Ar-H), 8.85 (s, 1 H, NH), 9.69 (s, 1 H, *p*-OH), 10.39 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Hydroxy-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'b**): δ/ppm = 76.6 (OCH_2 -), 114.6-114.8 (Ar-C-3), 122.3 (Ar-C-1), 127.6-129.0 (Bn-Ar-C), 129.0-129.6 (Ar-C-2), 154.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 158.4 (Ar-C-4).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Hydroxy-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'b**): δ/ppm = 154.5 (NH).

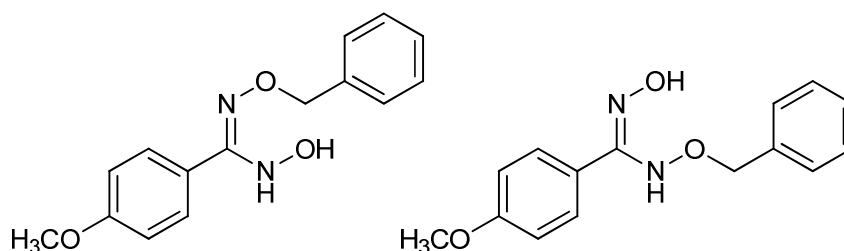
MS (ESI): m/z = 259 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.2 \text{ NH}_2\text{OH}$ (264.88)

Ber. C 63.48 H 5.56 N 11.63

Gef. C 63.82 H 5.44 N 11.74

7.1.2.8.2 *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'c**)



Es werden 4 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (742 mg) in 20 ml Dichlormethan gelöst und mit *O*-Benzylhydroxylamin versetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **10/10'c** in Ethylacetat gelöst und mit Cyclohexan gefällt. Durch Filtration erhält man die reine Substanz **10/10'c**. *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'c**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 55:45. Die Verbindung **10/10'c** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO-}d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 300 mg weißer Feststoff (28 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 103 °C

DC: R_f = 0.28 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3327, 3138, 2882, 1607, 1516, 1246, 1026, 822.

^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10c**): δ/ppm = 3.77 (s, 3 H, *p*- OCH_3), 5.01 (s, 2 H, OCH_2 -), 6.94 (m, 2 H, Ar-H), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.49 (m, 2 H, Ar-H), 8.51 (s, 1 H, NH), 8.52 (s, 1 H, (NHO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10c**): δ/ppm = 55.1 (*p*- OCH_3), 74.8 (OCH_2 -), 113.2-113.3 (Ar-C-3), 123.3 (Ar-C-1), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.9-129.5 (Ar-C-2), 157.1 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 160.0 (Ar-C-4).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10c**): δ/ppm = 131.2 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 87 Hz), 308.7 (=NOBn).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'c**): δ/ppm = 3.77 (s, 3 H, *p*- OCH_3), 4.71 (s, 2 H, OCH_2 -), 6.94 (m, 2 H, Ar-H), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.49 (m, 2 H, Ar-H), 8.91 (s, 1 H, NH), 10.48 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'c**): δ/ppm = 55.1 (*p*- OCH_3), 76.6 (OCH_2 -), 113.2-113.3 (Ar-C-3), 123.9 (Ar-C-1), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.9-129.5 (Ar-C-2), 154.5 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 159.9 (Ar-C-4).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methoxy-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'c**): δ/ppm = 154.4 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 81 Hz), 302.2 (=NOH).

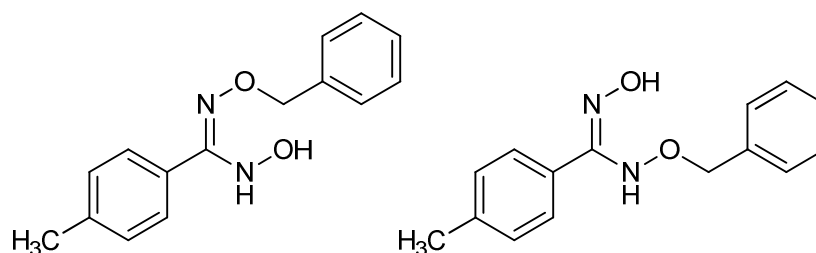
MS (ESI): m/z = 273 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (272.31)

Ber. C 66.16 H 5.92 N 10.29

Gef. C 66.27 H 5.88 N 10.27

7.1.2.8.3 *p*-Methyl-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'd**)



Es werden 3 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (509 mg) in 7 ml Dichlormethan gelöst und mit *O*-Benzylhydroxylamin versetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **10/10'd** in Ethylacetat gelöst und mit Petrolether gefällt. Durch Filtration erhält man die reine Substanz **10/10'd**. *p*-Methyl-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'd**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 54:46. Die Verbindung **10/10'd** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO-}d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 150 mg weißer Feststoff (20 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 114 °C

DC: R_f = 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3295, 3138, 2916, 1595, 1473, 1366, 1058, 1016, 818.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10d**): δ/ppm = 2.33 (s, 3 H, *p*- OCH_3), 5.02 (s, 2 H, OCH_2 -), 7.31 (m, 9 H, Ar-H), 8.52 (s, 1 H, (NHO)H), 8.54 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Methyl-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10d**): δ/ppm = 20.9 (*p*- CH_3), 74.8 (OCH_2 -), 127.4-128.1 (Ar-C-2), 128.2-128.7 (Bn-Ar-C), 128.3 (Ar-C-1), 128.5-128.7 (Ar-C-3), 138.6 (Ar-C-4), 157.3 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Methyl-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10d**): $\delta/\text{ppm} = 131.3$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 88$ Hz), 309.8 (=NOBn).

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'd**): $\delta/\text{ppm} = 2.33$ (s, 3 H, *p*-CH₃), 4.71 (s, 2 H, OCH₂-), 7.31 (m, 9 H, Ar-H), 8.94 (s, 1 H, NH), 10.55 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'd**): $\delta/\text{ppm} = 20.9$ (*p*-CH₃), 76.6 (OCH₂-), 127.4-128.1 (Ar-C-2), 128.2-128.7 (Bn-Ar-C), 128.5-128.7 (Ar-C-3), 128.9 (Ar-C-1), 138.4 (Ar-C-4), 154.8 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Methyl-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'd**): $\delta/\text{ppm} = 154.7$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 81$ Hz), 303.7 (=NOH).

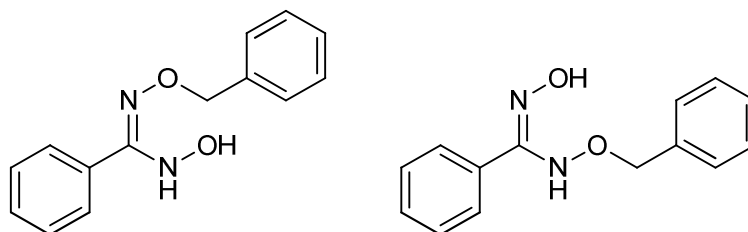
MS (ESI): $m/z = 257$ (M + H)⁺.

C₁₅H₁₆N₂O₂ (256.31)

Ber. C 70.29 H 6.29 N 10.93

Gef. C 70.34 H 6.16 N 10.75

7.1.2.8.4 *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'e**)



Es werden 5 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (778 mg) in 7 ml Diethylether gelöst. *O*-Benzylhydroxylamin wird in 5 ml Ethanol vorgelöst und langsam zu dem Hydroxamsäurechlorid **18e** getropft. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **10/10'e** in Ethylacetat gelöst und mit Petrolether gefällt. Durch Filtration erhält man die reine Substanz **10/10'e**. *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'e**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 52:48. Die Verbindung **10/10'e** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 474 mg weißer Feststoff (39 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 109 °C

DC: $R_f = 0.31$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3297, 3136, 2917, 1597, 1472, 1367, 1058, 1016.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10e**): $\delta/\text{ppm} = 5.03$ (s, 2 H, OCH₂-), 7.27 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.42 (m, 5 H, Ar-H), 8.55 (s, 1 H, (NHO)H), 8.62 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10e**): $\delta/\text{ppm} = 74.9$ (OCH₂-), 127.7 (Ar-C-2), 127.9-128.7 (Bn-Ar-C), 128.1-128.2 (Ar-C-3), 129.4 (Ar-C-4), 131.2 (Ar-C-1), 157.3 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10e**): $\delta/\text{ppm} = 131.4$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 88$ Hz), 310.4 (=NOBn).

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O'*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'e**): $\delta/\text{ppm} = 4.72$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.27 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.42 (m, 5 H, Ar-H), 9.01 (s, 1 H, NH), 10.62 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O'*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'e**): $\delta/\text{ppm} = 76.7$ (OCH_2 -), 127.7 (Ar-C-2), 127.9-128.7 (Bn-Ar-C), 128.1-128.2 (Ar-C-3), 129.1 (Ar-C-4), 131.7 (Ar-C-1), 154.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *O'*-Benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'e**): $\delta/\text{ppm} = 155.0$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 82$ Hz), 304.3 (=NOH).

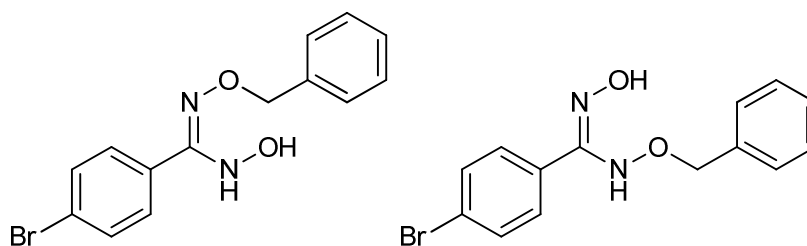
MS (ESI): $m/z = 243$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 91 [C_7H_7] $^+$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (242.28)

Ber. C 69.41 H 5.82 N 11.56

Gef. C 69.83 H 5.77 N 11.54

7.1.2.8.5 *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'f**)



Es werden 2 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (469 mg) in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit *O*-Benzylhydroxylamin versetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **10/10'f** in Cyclohexan angerieben. Durch Filtration erhält man die reine Substanz **10/10'f**. *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'f**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 53:47. Die Verbindung **10/10'f** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 300 mg weißer Feststoff (47 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 109 °C

DC: $R_f = 0.46$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3310, 3161, 2886, 1605, 1591, 1490, 1374, 1066, 1027, 813.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10f**): $\delta/\text{ppm} = 5.02$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 7.58 (m, 2 H, Ar-H), 8.61 (s, 1 H, (NHO)H), 8.70 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10f**): $\delta/\text{ppm} = 75.0$ (OCH_2 -), 122.5 (Ar-C-4), 127.5-128.8 (Bn-Ar-C), 129.5-130.1 (Ar-C-2), 130.8-130.9 (Ar-C-), 130.4 (Ar-C-1), 156.3 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10f**): $\delta/\text{ppm} = 131.3$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 91$ Hz), 310.5 (=NOBn).

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'f**): $\delta/\text{ppm} = 4.71$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.47 (m, 2 H, Ar-H), 7.58 (m, 2 H, Ar-H), 9.07 (s, 1 H, NH), 10.74 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'f**): $\delta/\text{ppm} = 76.7$ (OCH_2 -), 122.4 (Ar-C-4), 127.5-128.8 (Bn-Ar-C), 129.5-130.1 (Ar-C-2), 130.8-130.9 (Ar-C-3), 130.9 (Ar-C-1), 153.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Brom-*O*'-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'f**): $\delta/\text{ppm} = 155.6$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 85$ Hz).

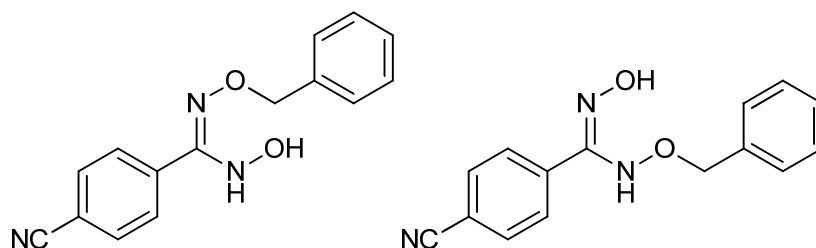
MS (ESI): $m/z = 321/323$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 91 [C_7H_7] $^+$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$ (321.18)

Ber. C 52.36 H 4.08 N 8.72

Gef. C 52.42 H 3.93 N 8.50

7.1.2.8.6 *p*-Cyano-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'g**)



Es werden 3 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (542 mg) in 15 ml Dichlormethan gelöst und mit *O*-Benzylhydroxylamin versetzt. Durch Flashchromatographie wird die reine Verbindung erhalten. *p*-Cyano-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'g**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 53:47. Die Verbindung **10/10'g** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 310 mg blassgelbes Öl (39 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.42$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3301, 3211, 3064, 2939, 2876, 2230, 1671, 1638, 1607, 1346, 1283, 1017, 847.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10g**): $\delta/\text{ppm} = 5.06$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.71 (m, 2 H, Ar-H), 7.84 (m, 2 H, Ar-H), 8.66 (s, 1 H, (NHO)H), 8.74 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10g**): $\delta/\text{ppm} = 75.3$ (OCH_2 -), 111.7 (Ar-C-4), 118.6 (*p*-CN), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.3-129.0 (Ar-C-2), 131.8-131.9 (Ar-C-3), 137.6 (Ar-C-1), 156.0 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10g**): $\delta/\text{ppm} = 131.6$ (NH), 313.6 (=NOBn).

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'g**): $\delta/\text{ppm} = 4.75$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.29 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.71 (m, 2 H, Ar-H), 7.84 (m, 2 H, Ar-H), 9.21 (s, 1 H, NH), 10.95 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'g**): $\delta/\text{ppm} = 76.8$ (OCH_2 -), 111.6 (Ar-C-4), 118.6 (*p*-CN), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.3-129.0 (Ar-C-2), 131.8-131.9 (Ar-C-3), 138.1 (Ar-C-1), 153.9 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Cyano-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'g**): $\delta/\text{ppm} = 154.7$ (NH).

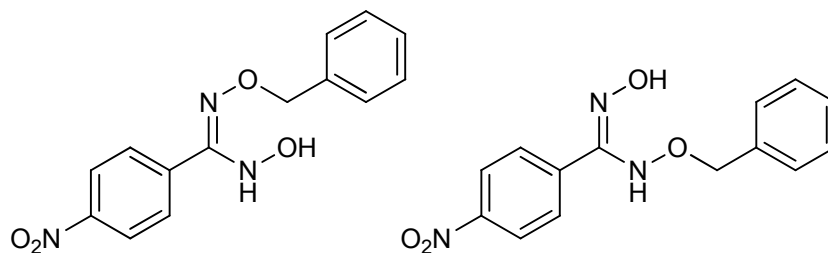
MS (ESI): $m/z = 268$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$.

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 0.1 \text{ EtOAc}$ (276.10)

Ber. C 66.99 H 5.04 N 15.22

Gef. C 66.92 H 4.69 N 14.98

7.1.2.8.7 *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'h**)



Es werden 2 mmol *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) (401 mg) in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit *O*-Benzylhydroxylamin versetzt. Nach Flashchromatographie wird die Verbindung **10/10'h** in Dichlormethan angerieben. Durch Filtration erhält man die reine Substanz **10/10'h**. *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10/10'h**) liegt in zwei tautomeren Formen vor, welche sich im NMR-Spektrum unterscheiden. Das Verhältnis beträgt laut NMR-Spektrum 51:49. Die Verbindung **10/10'h** ist instabil im NMR-Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$ und zersetzt sich während der Messung teilweise.

Ausbeute: 494 mg gelbes Pulver (86 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 121 °C

DC: $R_f = 0.34$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : kurzzeitig blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3313, 3205, 3109, 3031, 2933, 2874, 1641, 1600, 1519, 1341, 939, 855.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10h**): $\delta/\text{ppm} = 5.08$ (s, 2 H, OCH_2 -), 7.30 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.78 (m, 2 H, Ar-H), 8.23 (m, 2 H, Ar-H), 8.75 (s, 1 H, (NHO)H), 8.91 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) von *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10h**): $\delta/\text{ppm} = 75.3$ (OCH_2 -), 123.0-123.1 (Ar-C-3), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.9-129.3 (Ar-C-2), 138.1 (Ar-C-1), 147.6 (Ar-C-4), 155.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Nitro-*O*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10h**): δ/ppm = 131.8 (NH), 314.2 (=NOBn), 370.1 (*p*-NO₂).

^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Nitro-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'h**): δ/ppm = 4.76 (s, 2 H, OCH₂-), 7.30 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.78 (m, 2 H, Ar-H), 8.23 (m, 2 H, Ar-H), 9.25 (s, 1 H, NH), 11.10 (s, 1 H, (=NO)H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Nitro-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'h**): δ/ppm = 76.8 (OCH₂-), 123.0-123.1 (Ar-C-3), 127.5-128.9 (Bn-Ar-C), 128.9-129.3 (Ar-C-2), 137.7 (Ar-C-1), 147.6 (Ar-C-4), 153.3 (C_q(NN)).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) von *p*-Nitro-*O'*-benzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**10'h**): δ/ppm = 154.9 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 82 Hz), 370.1 (*p*-NO₂).

MS (ESI): m/z = 288 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 91 [C_7H_7]⁺.

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot 0.1 \text{ C}_6\text{H}_{12} \cdot 0.1 \text{ H}_2\text{O}$ (297.49)

Ber. C 58.95 H 4.88 N 14.12

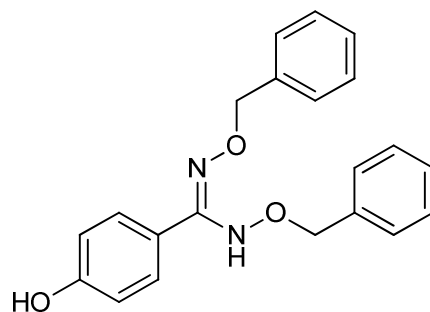
Gef. C 59.07 H 4.49 N 14.13

7.1.2.9 Synthese von *para*-substituierten *O,O'*-Dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift:¹⁵⁸

Zwei Äquivalente *O*-Benzylhydroxylamin werden zu einer Lösung aus dem entsprechenden Hydroxamsäurechlorid **18** in Dichlormethan, Diethylether oder Dichlormethan/Diethylether gegeben. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur und das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 2 %ige FeCl₃-Lösung als Sprühreagenz verfärbt das Produkt **32** gelb) verfolgt. Nach 24 h wird der Ansatz erneut mit zwei Äquivalenten *O*-Benzylhydroxylamin versetzt, wenn mittels DC noch Hydroxamsäurechlorid **18** detektiert wird. Dieses Vorgehen wird nach weiteren 24 h wiederholt. Für gewöhnlich ist die Reaktion nach 48-72 h beendet und das Fällungsprodukt wird abfiltriert. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingeeengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **32** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.9.1 *p*-Hydroxy-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32b**)



Zu 2 mmol *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) (343 mg), gelöst in 15 ml Diethylether/Dichlormethan 1:1, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 48 h wird die reine Verbindung **32b** erhalten.

Ausbeute: 129 mg blassgelbes Öl (19 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.63$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 4.2 (ber. $\log D = 3.65$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3300, 3064, 3031, 2927, 2874, 1607, 1519, 1362, 1211, 1024, 836.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 4.67$ (s, 2 H, $(\text{NHO})\text{CH}_2-$), 5.03 (s, 2 H, $(=\text{NO})\text{CH}_2-$), 6.78 (d, 2 H, Ar-H), 7.27 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.28 (d, 2 H, Ar-H), 9.23 (s, 1 H, NH), 9.73 (s, 1 H, *p*-OH).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 74.9$ ($=\text{NOCH}_2-$), 76.9 (NHOCH_2-), 114.7 (Ar-C-3), 121.2 (Ar-C-1), 127.5-128.8 (Bn-Ar-C), 129.4 (Ar-C-2), 155.5 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 158.6 (Ar-C-4).

^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 157.0$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 86$ Hz), 311.5 ($=\text{NOBn}$).

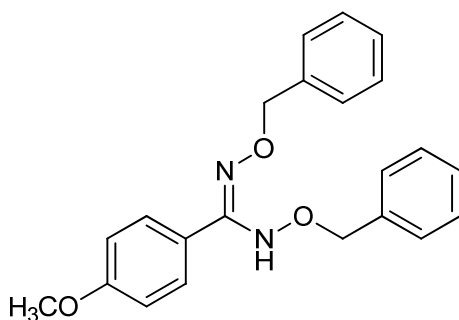
MS (ESI): $m/z = 349$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.3 \text{ H}_2\text{O}$ (353.81)

Ber. C 71.29 H 5.87 N 7.92

Gef. C 71.36 H 5.86 N 8.08

7.1.2.9.2 *p*-Methoxy-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32c**)



Zu 4 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (742 mg), gelöst in 20 ml Dichlormethan, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 24 h wird die reine Verbindung **32c** erhalten.

Ausbeute: 107 mg blassgelbes Öl (7 %)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.64$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 4.7 (ber. $\log D = 2.86$)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3305, 3063, 3031, 2934, 2873, 2838, 1606, 1516, 1454, 1362, 1249, 1026, 831.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 3.78$ (*p*- OCH_3), 4.67 (s, 2 H, $(\text{NHO})\text{CH}_2-$), 5.04 (s, 2 H, $(=\text{NO})\text{CH}_2-$), 6.95 (d, 2 H, Ar-H), 7.25 (m, 5 H, Bn-Ar-H), 7.44 (d, 2 H, Ar-H), 9.29 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 55.2 ($p\text{-OCH}_3$), 75.0 ($=\text{NOCH}_2^-$), 76.9 (NHOCH_2^-), 113.3 (Ar-C-3), 122.8 (Ar-C-1), 127.5-128.8 (Bn-Ar-C), 129.4 (Ar-C-2), 155.1 ($\text{C}_q(\text{NN})$), 160.2 (Ar-C-4).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 157.1 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz), 312.2 ($=\text{NOBn}$).

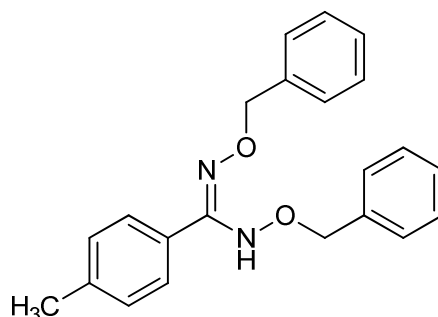
MS (ESI): m/z = 363 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ (362.43)

Ber. C 72.91 H 6.12 N 7.73

Gef. C 72.60 H 6.06 N 7.73

7.1.2.9.3 *p*-Methyl-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (32d)



Zu 2 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (339 mg), gelöst in 10 ml Diethylether, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 96 h wird die reine Verbindung **32d** erhalten.

Ausbeute: 200 mg blassgelbes Öl (29 %) ¹⁵⁸

DC: R_f = 0.66 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 4.9 (ber. $\log D$ = 3.54) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3308, 3063, 3032, 2920, 2870, 1605, 1451, 1362, 1019, 819.

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 2.33 ($p\text{-CH}_3$), 4.69 (s, 2 H, (NHO) CH_2^-), 5.05 (s, 2 H, ($=\text{NO}$) CH_2^-), 7.27 (m, 14 H, Ar-H), 9.34 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 20.9 ($p\text{-CH}_3$), 75.1 ($=\text{NOCH}_2^-$), 76.9 (NHOCH_2^-), 127.5 (Ar-C-1), 127.6-128.8 (Bn-Ar-C), 127.9 (Ar-C-2), 128.1 (Ar-C-3), 139.0 (Ar-C-4), 155.4 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

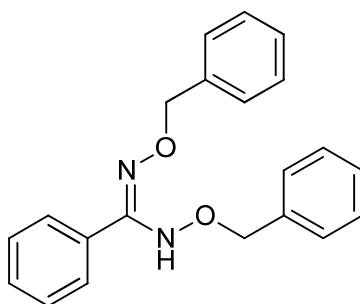
^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 157.1 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 86 Hz), 313.1 ($=\text{NOBn}$).

MS (ESI): m/z = 347 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.1 \text{ H}_2\text{O}$ (348.23)

Ber. C 75.88 H 6.43 N 8.04

Gef. C 75.68 H 6.28 N 8.22

7.1.2.9.4 *O,O'*-Dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (32e)

4 mmol *p*-Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (622 mg) werden in 5 ml Diethylether gelöst. *O*-Benzylhydroxylamin wird in 10 ml Ethanol vorgelöst und langsam zu der rührenden Hydroxylaminlösung getropft. Durch Flashchromatographie nach 24 h wird die reine Verbindung **32e** erhalten.

Ausbeute: 640 mg farbloses Öl (48 %) ¹⁵⁸

DC: $R_f = 0.63$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : gelb)

$\log D$: 4.5 (ber. $\log D = 3.26$) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3309, 3062, 3031, 2920, 2873, 1603, 1454, 1361, 1250, 1025, 821.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 4.69$ (s, 2 H, $(\text{NHO})\text{CH}_2^-$), 5.07 (s, 2 H, $(=\text{NO})\text{CH}_2^-$), 7.29 (m, 15 H, Ar-H), 9.44 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 75.1$ ($=\text{NOCH}_2^-$), 77.1 (NHOCH_2^-), 127.6-128.8 (Bn-Ar-C), 127.9 (Ar-C-2), 128.2 (Ar-C-3), 129.5 (Ar-C-4), 130.8 (Ar-C-1), 155.5 ($\text{C}_q(\text{NN})$).

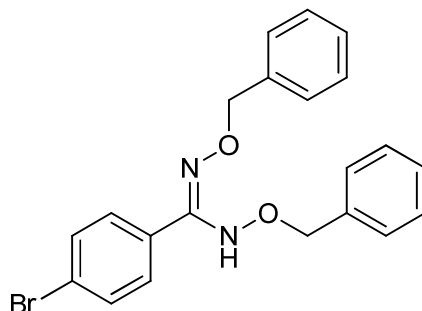
$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 157.3$ (NH, $^1J_{\text{N,H}} = 86$ Hz), 313.3 ($=\text{NOBn}$).

MS (ESI): $m/z = 333$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.01 \text{ C}_6\text{H}_{12}$ (335.26)

Ber. C 75.45 H 6.65 N 8.36

Gef. C 75.84 H 6.07 N 8.60

7.1.2.9.5 *p*-Brom-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (32f)

Zu 2 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (469 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 120 h wird die reine Verbindung **32f** erhalten.

Ausbeute: 367 mg weißer Feststoff (45 %)¹⁵⁸

Schmp.: 71 °C

DC: R_f = 0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: gelb)

log*D*: 5.1 (ber. log*D* = 4.14)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3294, 3061, 3030, 2918, 2881, 1605, 1591, 1453, 1357, 1041, 822.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 4.69 (s, 2 H, (NHO)CH₂-), 5.06 (s, 2 H, (=NO)CH₂-), 7.25 (m, 10 H, Bn-Ar-H), 7.42 (d, 2 H, Ar-H), 7.59 (d, 2 H, Ar-H), 9.50 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 75.2 (=NOCH₂-), 77.1 (NHOCH₂-), 122.8 (Ar-C-4), 127.6-128.8 (Bn-Ar-C), 129.9 (Ar-C-1), 130.0 (Ar-C-2), 130.9 (Ar-C-3), 154.5 (C_q(NN)).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 157.1 (NH, ¹*J*_{N,H} = 88 Hz), 313.9 (=NOBn).

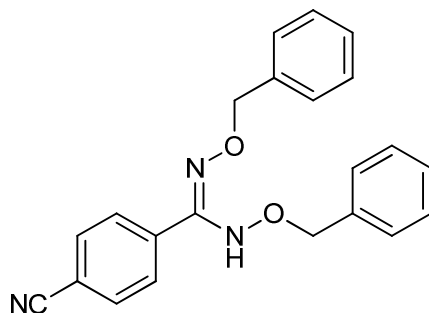
MS (ESI): m/z = 411/413 [M + H]⁺.

C₂₁H₁₉N₂O₂Br·0.1 EtOAc (420.12)

Ber. C 61.18 H 4.75 N 6.67

Gef. C 61.14 H 4.63 N 6.60

7.1.2.9.6 *p*-Cyano-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**32g**)



Zu 3 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (542 mg), gelöst in 15 ml Dichlormethan, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 96 h wird die reine Verbindung **32g** erhalten.

Ausbeute: 116 mg weißer Feststoff (11 %)¹⁵⁸

Schmp.: 90 °C

DC: R_f = 0.64 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: gelb)

log*D*: 4.5 (ber. log*D* = 3.46)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3308, 3251, 3090, 3033, 2875, 2231, 1603, 1455, 1367, 1014, 850.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 4.71 (s, 2 H, (NHO)CH $_2$ -), 5.09 (s, 2 H, (=NO)CH $_2$ -), 7.26 (m, 10 H, Bn-Ar-H), 7.62 (d, 2 H, Ar-H), 7.84 (d, 2 H, Ar-H), 9.64 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 75.5 (=NOCH $_2$ -), 77.2 (NHOCH $_2$ -), 111.9 (Ar-C-4), 118.5 (*p*-CN), 127.7-128.9 (Bn-Ar-C), 128.8 (Ar-C-2), 131.9 (Ar-C-3), 137.8 (Ar-C-1), 154.1 (C $_q$ (NN)).

$^{15}\text{N-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 157.3 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 87 Hz), 316.4 (=NOBn).

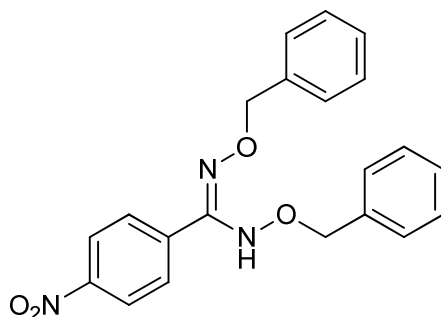
MS (ESI): m/z = 358 [M + H] $^+$.

C $_{22}$ H $_{19}$ N $_3$ O $_2$ (357.41)

Ber. C 73.93 H 5.36 N 11.76

Gef. C 74.01 H 5.30 N 11.70

7.1.2.9.7 *p*-Nitro-*O,O'*-dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (32h)



Zu 2 mmol *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) (401 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, wird *O*-Benzylhydroxylamin gegeben. Durch Flashchromatographie nach 96 h wird die reine Verbindung **32h** erhalten.

Ausbeute: 90 mg gelbes Öl (12 %)¹⁵⁸

DC: R_f = 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl $_3$: gelb)

log*D*: 4.7 (ber. log*D* = 4.31)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm $^{-1}$) = 3313, 3062, 3028, 2944, 2886, 1618, 1584, 1516, 1347, 1020, 858.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 4.73 (s, 2 H, (NHO)CH $_2$ -), 5.11 (s, 2 H, (=NO)CH $_2$ -), 7.27 (m, 10 H, Bn-Ar-H), 7.71 (d, 2 H, Ar-H), 8.23 (d, 2 H, Ar-H), 9.69 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 75.5 (=NOCH $_2$ -), 77.2 (NHOCH $_2$ -), 123.1 (Ar-C-3), 127.7-129.0 (Bn-Ar-C), 129.2 (Ar-C-2), 137.1 (Ar-C-1), 147.8 (Ar-C-4), 153.8 (C $_q$ (NN)).

$^{15}\text{N-NMR}$ (DMSO- d_6): δ/ppm = 157.2 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 87 Hz), 317.0 (=NOBn), 370.1 (*p*-NO $_2$).

MS (ESI): m/z = 378 [M + H] $^+$.

C $_{21}$ H $_{19}$ N $_3$ O $_4$ (377.40)

Ber. C 66.83 H 5.07 N 11.13

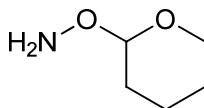
Gef. C 66.79 H 5.01 N 11.08

7.1.2.10 Synthese von *para*-substituierten *O*-Tetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift:¹⁵⁸

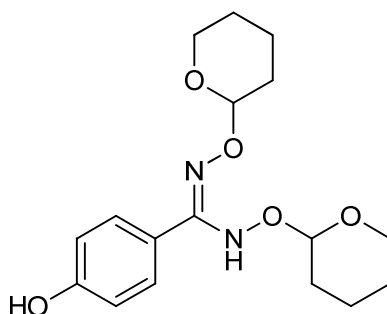
Zwei Äquivalente *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin werden zu einer Lösung aus dem entsprechenden Hydroxamsäurechlorid **18** in Dichlormethan gegeben. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur und das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 2 %ige FeCl₃-Lösung als Sprühreagenz verfärbt das Produkt blau) verfolgt. Nach 24 h wird der Ansatz erneut mit zwei Äquivalenten *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin versetzt, wenn mittels DC noch Hydroxamsäurechlorid **18** detektiert wird. Dieses Vorgehen wird nach weiteren 24 h wiederholt. Für gewöhnlich ist die Reaktion nach 48-72 h beendet und das Fällungsprodukt wird abfiltriert. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindungen **27** werden bei -18 °C gelagert.

7.1.2.10.1 *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**)



Die Substanz wird nach der Literaturvorschrift von Haslanger *et al.* [1986] hergestellt.¹³¹ Dabei reagiert *N*-Hydroxyphthalimid (**37**) und 2,3-Dihydropyran (**38**) in trockenem Dichlormethan und Dioxan unter Zugabe katalytischer Mengen an *p*-Tosylsulfonsäure zu *N*-Tetrahydropyranyloxyphthalimid (**39**), welches durch Reaktion mit Methylhydrazin zum *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gespalten wird. Nach Destillation (Siedep.: 71 °C bei 13 mbar) erhält man das reine Produkt **40**.

7.1.2.10.2 *p*-Hydroxy-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27b**)



Zu 1.1 mmol *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) (189 mg), gelöst in 10 ml Diethylether/Dichlormethan 1:1, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 96 h wird die reine Verbindung **27b** erhalten.

Ausbeute: 334 mg blassgelbes Öl (90 %)¹⁵⁸

DC: R_f = 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl₃: blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3229, 2945, 2870, 1608, 1519, 1355, 1275, 1203, 1109, 1036, 928.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 1.56 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.42 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.74 (m, 1 H, (NHO)THP), 4.56 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.76 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.10 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 6.77 (d, 2 H, Ar-H), 7.37 (d, 2 H, Ar-H, ds = 3.4 Hz), 8.78 (s, 1 H, NH, ds = 3.3 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 18.8-19.5 (2 C, 2 THP-C-4), 24.1-25.0 (2 C, 2 THP-C-5), 28.0-28.7 (2 C, 2 THP-C-3), 61.4-61.9 (2 C, 2 THP-C-6), 99.7-99.9 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.4-101.7 (1 C, (NHO)THP-C-2), 114.7 (Ar-C-3, ds = 0.7 Hz), 120.9 (Ar-C-1, ds = 4.3 Hz), 129.5 (Ar-C-2, ds = 4.7 Hz), 155.6 ($\text{C}_q(\text{NN})$, ds = 0.7 Hz), 158.7 (Ar-C-4, ds = 2.8 Hz).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 149.4 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz, ds = 36 Hz), 310.5 (=NOTHP, ds = 19 Hz).

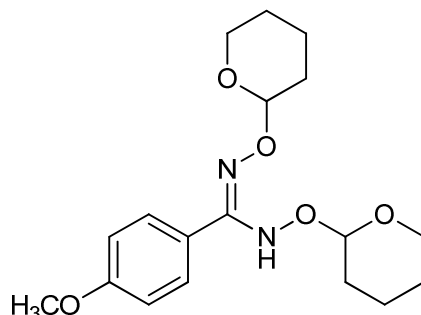
MS (ESI): m/z = 359 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 337 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 253 $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}]^+$, 169 $[\text{M} - 2 \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 0.6 \text{H}_2\text{O}$ (347.20)

Ber. C 58.81 H 7.32 N 8.07

Gef. C 58.60 H 7.43 N 8.32

7.1.2.10.3 *p*-Methoxy-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (27c)



Zu 3 mmol *p*-Methoxybenzhydroxamsäurechlorid (**18c**) (557 mg), gelöst in 15 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 48 h wird die reine Verbindung **27c** erhalten.

Ausbeute: 448 mg klares Öl (47 %) ¹⁵⁸

DC: R_f = 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3323, 2941, 2851, 1609, 1516, 1353, 1250, 1203, 1110, 1035, 927.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 1.57 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.48 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.69 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.80 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.77 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.13 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 6.96 (d, 2 H, Ar-H), 7.49 (d, 2 H, Ar-H, ds = 3.5 Hz), 8.86 (s, 1 H, NH, ds = 3.8 Hz).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 18.7-19.2 (2 C, 2 THP-C-4), 24.6-24.9 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.7 (2 C, 2 THP-C-3), 55.1 (p -OCH $_3$), 61.4-61.8 (2 C, 2 THP-C-6), 99.8-100.0 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.4-101.7 (1 C, (NHO)THP-C-2), 113.3 (Ar-C-3, ds = 0.8 Hz), 122.5 (Ar-C-1, ds = 5.3 Hz), 129.5 (Ar-C-2, ds = 4.8 Hz), 155.3 (C $_q$ (NN), ds = 0.6 Hz), 160.2 (Ar-C-4, ds = 4.8 Hz).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 149.9 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 87 Hz, ds = 38 Hz), 311.2 (=NOTHP, ds = 17 Hz).

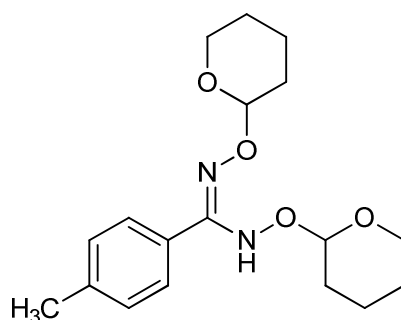
MS (ESI): m/z = 373 [M + Na] $^+$, 351 [M + H] $^+$, 267 [M - C $_5\text{H}_8\text{O}$ + H] $^+$, 183 [M - 2 C $_5\text{H}_8\text{O}$ + H] $^+$.

C $_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ (350.42)

Ber. C 61.70 H 7.48 N 7.99

Gef. C 61.47 H 7.50 N 7.66

7.1.2.10.4 *p*-Methyl-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (27d)



Zu 2 mmol *p*-Methylbenzhydroxamsäurechlorid (**18d**) (339 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 48 h wird die reine Verbindung **27d** erhalten.

Ausbeute: 340 mg farbloses Öl (49 %)¹⁵⁸

DC: R_f = 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl $_3$: blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm $^{-1}$) = 3328, 2942, 2869, 1608, 1517, 1353, 1203, 1110, 1037, 928.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 1.58 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.49 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.70 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.81 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.80 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.16 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 7.21 (d, 2 H, Ar-H), 7.46 (d, 2 H, Ar-H, ds = 3.7 Hz), 8.87 (s, 1 H, NH, ds = 4.2 Hz).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 18.7-19.2 (2 C, 2 THP-C-4), 20.8 (p -CH $_3$), 24.6-24.9 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.7 (2 C, 2 THP-C-3), 61.4-61.8 (2 C, 2 THP-C-6), 99.9-100.1 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.5-101.8 (1 C, (NHO)THP-C-2), 127.6 (Ar-C-1, ds = 5.5 Hz), 128.0 (Ar-C-2, ds = 4.7 Hz), 128.5 (Ar-C-3, ds = 0.7 Hz), 139.1 (Ar-C-4, ds = 4.1 Hz), 155.6 (C $_q$ (NN), ds = 0.8 Hz).

^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 149.7 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 84 Hz, ds = 39 Hz), 312.1 (=NOTHP, ds = 21 Hz).

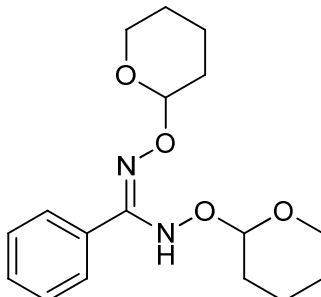
MS (ESI): m/z = 357 [M + Na] $^+$, 335 [M + H] $^+$, 251 [M - C $_5\text{H}_8\text{O}$ + H] $^+$, 167 [M - 2 C $_5\text{H}_8\text{O}$ + H] $^+$.

$C_{18}H_{26}N_2O_4$ (334.42)

Ber. C 64.65 H 7.84 N 8.38

Gef. C 64.53 H 7.81 N 8.24

7.1.2.10.5 *O,O'*-Bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27e**)



Zu 1.1 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (171 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 120 h wird die reine Verbindung **27e** erhalten.

Ausbeute: 209 mg farbloses Öl (59 %) ¹⁵⁸

DC: R_f = 0.44 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; $FeCl_3$: blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3326, 3060, 2943, 2869, 1607, 1571, 1353, 1203, 1110, 1037, 935.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

1H -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 1.56 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.47 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.68 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.82 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.80 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.15 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 7.43 (m, 3 H, Ar-H), 7.55 (m, 2 H), 8.99 (s, 1 H, NH, ds = 5.3 Hz).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 18.6-19.2 (2 C, 2 THP-C-4), 24.6-24.9 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.7 (2 C, 2 THP-C-3), 61.5-61.8 (2 C, 2 THP-C-6), 100.0-100.1 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.6-101.9 (1 C, (NHO)THP-C-2), 127.9 (Ar-C-3, ds = 0.7 Hz), 128.1 (Ar-C-2, ds = 4.4 Hz), 129.5 (Ar-C-4, ds = 3.3 Hz), 130.5 (Ar-C-1, ds = 4.2 Hz), 155.7 ($C_q(NN)$, ds = 4.2 Hz).

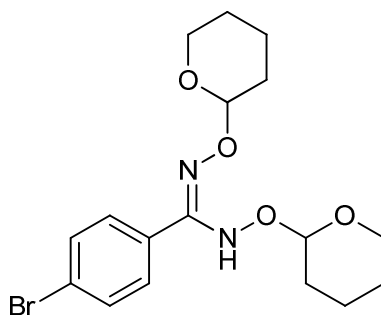
^{15}N -NMR (DMSO- d_6): δ/ppm = 150.6 (NH, $^1J_{N,H}$ = 86 Hz, ds = 33 Hz), 312.2 (=NOTHP, ds = 23 Hz).

MS (ESI): m/z = 343 [$M + Na$] $^+$, 321 [$M + H$] $^+$, 237 [$M - C_5H_8O + H$] $^+$, 153 [$M - 2C_5H_8O + H$] $^+$.

$C_{17}H_{24}N_2O_4$ (320.39)

Ber. C 63.73 H 7.55 N 8.74

Gef. C 63.74 H 7.58 N 8.68

7.1.2.10.6 *p*-Brom-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27f**)

Zu 1.1 mmol *p*-Brombenzhydroxamsäurechlorid (**18f**) (258 mg), gelöst in 10 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 120 h wird die reine Verbindung **27f** erhalten.

Ausbeute: 245 mg farbloses Öl (56 %) ¹⁵⁸

DC: R_f = 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3321, 2943, 2869, 1607, 1353, 1203, 1111, 1037, 931.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 1.57 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.46 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.63 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.79 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.79 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.14 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 7.49 (d, 2 H, Ar-H, ds = 3.0 Hz), 7.62 (d, 2 H, Ar-H), 9.05 (s, 1 H, NH, ds = 5.2 Hz).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 18.7-19.1 (2 C, 2 THP-C-4), 24.6-24.8 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.6 (2 C, 2 THP-C-3), 61.4-61.9 (2 C, 2 THP-C-6), 100.0-100.2 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.7-102.0 (1 C, (NHO)THP-C-2), 123.0 (Ar-C-4, ds = 3.2 Hz), 129.8 (Ar-C-1, ds = 6.1 Hz), 130.2 (Ar-C-2, ds = 4.8 Hz), 131.0 (Ar-C-3, ds = 0.6 Hz), 154.7 ($\text{C}_q(\text{NN})$, ds = 2.3 Hz).

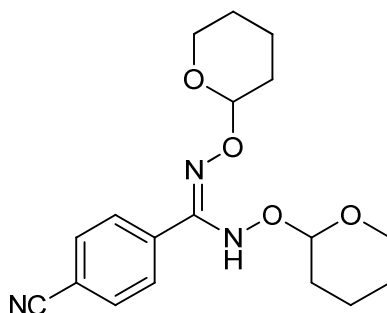
^{15}N -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 150.6 (NH, $^1J_{\text{N,H}}$ = 85 Hz, ds = 35 Hz), 312.7 (=NOTHP, ds = 25 Hz).

MS (ESI): m/z = 421/423 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 399/401 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 315/317 [$\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}$] $^+$, 231/233 [$\text{M} - 2\text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$ (399.29)

Ber. C 51.14 H 5.81 N 7.02

Gef. C 51.46 H 5.82 N 6.70

7.1.2.10.7 *p*-Cyano-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27g**)

Zu 3 mmol *p*-Cyanobenzhydroxamsäurechlorid (**18g**) (542 mg), gelöst in 15 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 7 d wird die reine Verbindung **27g** erhalten.

Ausbeute: 614 mg weißer Feststoff (59 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 125 °C

DC: R_f = 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3296, 2945, 2851, 2232, 1606, 1365, 1205, 1112, 1039, 944.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.58 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.45 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.59 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.79 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.82 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.16 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 7.73 (d, 2 H, Ar-H, ds = 2.0 Hz), 7.88 (d, 2 H, Ar-H), 9.20 (s, 1 H, NH, ds = 6.6 Hz).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 18.7-19.0 (2 C, 2 THP-C-4), 24.5-24.8 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.5 (2 C, 2 THP-C-3), 61.3-62.0 (2 C, 2 THP-C-6), 100.2-100.3 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.9-102.4 (1 C, (NHO)THP-C-2), 112.0 (Ar-C-4, ds = 2.2 Hz), 118.4 (*p*-CN), 129.0 (Ar-C-2, ds = 4.1 Hz), 131.9 (Ar-C-3, ds = 0.4 Hz), 135.2 (Ar-C-1, ds = 5.9 Hz), 154.4 (C_q(NN), ds = 3.3 Hz).

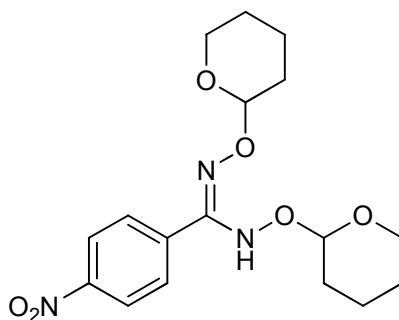
¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 151.3 (NH, ¹*J*_{N,H} = 87 Hz, ds = 25 Hz).

MS (ESI): m/z = 368 [M + Na]⁺, 346 [M + H]⁺, 262 [M - C₅H₈O + H]⁺, 178 [M - 2C₅H₈O + H]⁺.

C₁₈H₂₃N₃O₄·0.1 C₆H₁₂·0.1 EtOAc (362.63)

Ber. C 62.93 H 6.95 N 11.59

Gef. C 63.04 H 6.78 N 11.54

7.1.2.10.8 *p*-Nitro-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27h**)

Zu 3 mmol *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) (602 mg), gelöst in 15 ml Dichlormethan, wird *O*-Tetrahydropyranylhydroxylamin (**40**) gegeben. Durch Flashchromatographie nach 120 h wird die reine Verbindung **27h** erhalten.

Ausbeute: 578 mg gelber Feststoff (53 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 120 °C

DC: R_f = 0.42 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: grünblau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3307, 3117, 2943, 2868, 1587, 1511, 1342, 1203, 1110, 1036, 944.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.58 (m, 12 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.46 (m, 2 H, (NHO)THP, (=NO)THP), 3.60 (m, 1 H, (NHO)THP), 3.80 (m, 1 H, (=NO)THP), 4.84 (m, 1 H, O-CH-O ((NHO)THP)), 5.18 (m, 1 H, O-CH-O ((=NO)THP)), 7.82 (d, 2 H, Ar-H, ds = 2.8 Hz), 8.27 (d, 2 H, Ar-H), 9.25 (s, 1 H, NH, ds = 5.5 Hz).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 18.7-18.9 (2 C, 2 THP-C-4), 24.5-24.8 (2 C, 2 THP-C-5), 27.9-28.5 (2 C, 2 THP-C-3), 61.5-62.0 (2 C, 2 THP-C-6), 100.3 (1 C, (=NO)THP-C-2), 102.0-102.3 (1 C, (NHO)THP-C-2), 123.1 (Ar-C-3), 129.5 (Ar-C-2, ds = 3.0 Hz), 137.0 (Ar-C-1, ds = 8.4 Hz), 147.9 (Ar-C-4, ds = 1.9 Hz), 154.1 (C_q(NN)).

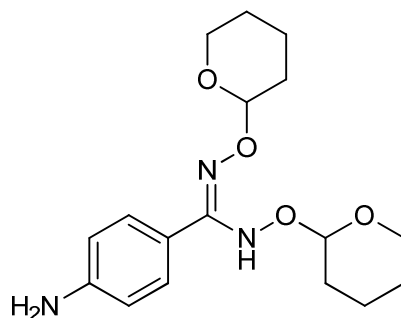
¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 151.2 (NH, ¹J_{N,H} = 85 Hz, ds = 33 Hz), 315.8 (=NOTHP, ds = 34 Hz), 369.9 (*p*-NO₂).

MS (ESI): m/z = 388 [M + Na]⁺, 366 [M + H]⁺, 282 [M - C₅H₈O + H]⁺, 198 [M - 2C₅H₈O + H]⁺.

C₁₇H₂₃N₃O₆ (365.39)

Ber. C 55.88 H 6.34 N 11.50

Gef. C 56.15 H 6.34 N 11.20

7.1.2.10.9 *p*-Amino-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**)

p-Amino-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) wird aus dem zuvor synthetisierten *p*-Nitro-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27h**) hergestellt.¹¹⁶

Zu einer Lösung aus 2.86 mmol *p*-Nitro-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27h**) (1.04 g) in 20 ml Tetrahydrofuran wird eine Lösung aus 11 Äquivalenten Natriumdithionit (31.44 mmol, 5.47 g) in 20 ml Wasser langsam über 2 h bei Raumtemperatur zugetropft. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1, FeCl₃ verfärbt das Produkt **27a** blau nach Erhitzen) verfolgt. Nach weiteren 3 h Rühren bei Raumtemperatur werden 30 ml Wasser zum Ansatz gegeben und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird evaporiert, das Rohprodukt **27a** auf Kieselgel aufgezogen und mittels Flashchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 161 mg gelbes Öl (17 %)¹¹⁶

DC: R_f = 0.28 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; FeCl₃: blau nach Erhitzen)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3425, 3346, 3239, 2944, 2864, 1610, 1372, 1050.

NMR-Spektroskopie: Für jeden Kern ist der Mittelwert der chemischen Verschiebung der Diastereomere und die Differenz der Signale (ds) – wenn vorhanden – in Hz angegeben.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.31-1.81 (m, 12 H, THP), 3.45-3.50 (m, 2 H, THP), 3.70-3.80 (m, 2 H, THP), 4.74-4.78 (m, 1 H, THP), 5.08-5.12 (m, 1 H, THP), 5.41 (br s, 2 H, NH₂), 6.54 (d, 2 H, Ar-H), 7.22 (d, 2 H, Ar-H, ds = 3.5 Hz), 8.64 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 18.7-19.3 (2 C, 2 THP-C-4), 24.6-24.9 (2 C, 2 THP-C-5), 28.0-28.7 (2 C, 2 THP-C-3), 61.3-61.8 (2 C, 2 THP-C-6), 99.6-99.8 (1 C, (=NO)THP-C-2), 101.2-101.5 (1 C, (NHO)THP-C-2), 112.8 (Ar-CH), 116.9 (Ar-C_q, ds = 4.7 Hz), 129.0 (Ar-CH, ds = 4.1 Hz), 150.2 (C-NH₂, ds = 2.5 Hz), 156.1 (C=N, ds = 1.3 Hz).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 64 (NH₂), 148.0 (NH, ds = 6 Hz), 309.5 (=N, ds = 17 Hz).

MS (ESI): m/z = 336.5 [M + H]⁺, 252.5 [M – C₅H₈O + H]⁺, 168.5 [M – 2C₅H₈O + H]⁺.

C₁₇H₂₅N₃O₄·0.5 H₂O (344.41)

Ber. C 59.29 H 7.61 N 12.20

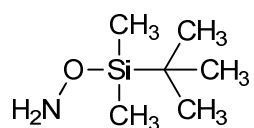
Gef. C 59.11 H 7.66 N 11.94

7.1.2.11 Synthese von *para*-substituierten *O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

Allgemeine Vorschrift:¹¹⁶

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden *para*-substituierten Benzhydroxamsäurechlorid **18** in DCM werden unter Rühren zwei Äquivalente TBDMS-Hydroxylamin **42** hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 6-10 d wird der Niederschlag mit Vakuum abgesaugt und das Lösungsmittel evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit Cyclohexan als Fließmittel.

7.1.2.11.1 *O*-*tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (**42**)



Die Synthese von *O*-*tert*-Butyldimethylsilylhydroxylamin (**42**) wird in Anlehnung an Bottaro *et al.* [1985] durchgeführt.²²⁷

Es werden 83.3 mmol Ethylendiamin (5.62 ml) in 25 ml Dichlormethan gelöst und 1 Äquivalent fein gepulvertes Hydroxylaminhydrochlorid (5.79 g) hinzugefügt. Der Ansatz rührt bei Raumtemperatur verschlossen über 6 Stunden und bildet zwei Phasen aus. Es wird ein Rückflusskühler angeschlossen und 83.3 mmol *tert*-Butyldimethylchlorsilan (**41**) (12.55 g), vorgelöst in wenig Dichlormethan, langsam über eine Stunde zugetropft. Der Rückflusskühler wird entfernt und der Ansatz 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird Dichlormethan evaporiert und der Rückstand unter Vakuum destilliert.

Ausbeute: 6.27 g weiße Kristalle (51 %)

Schmp.: 61-64 °C

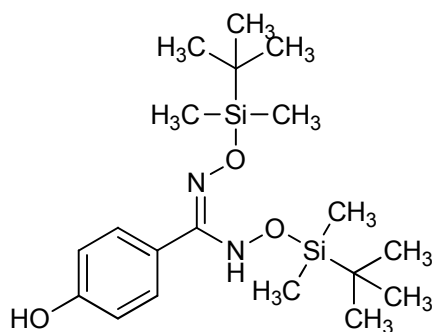
Siedep.: 123 °C bei 0.3 bar

¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm = 0.12 (s, 6 H, 2 CH₃), 0.92 (s, 9 H, *t*-Butyl), 5.07 (br s, 2 H, NH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ/ppm = -5.8 (CH₃), 18.1 (C_q), 26.2 (*t*-Butyl-CH₃).

¹⁵N-NMR (CDCl₃): δ/ppm = 122.0 (NH₂).

²⁹Si-NMR (CDCl₃): δ/ppm = 26.1.

7.1.2.11.2 *p*-Hydroxy-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28b**)

Es werden 8 mmol *p*-Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid (**18b**) (1.37 g) in 30 ml DCM mit 16 mmol TBDMS-Hydroxylamin **42** (2.35 g) versetzt. Der Ansatz rührt 6 d bei Raumtemperatur. Das Produkt **28b** ist bei Raumtemperatur instabil und zersetzt sich innerhalb eines Monats komplett zu einem schwarzen Öl.

Ausbeute: 1.74 g weißer Feststoff (55 %) ¹¹⁶

Schmp.: 83 °C

DC: $R_f = 0.44$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : nach 5 Minuten blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3331, 2954, 2930, 2858, 1613, 1252, 831.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 0.05 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.21 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.84 (s, 9 H, 3 CH_3), 0.98 (s, 9 H, 3 CH_3), 6.66 (d, 2 H, Ar-H), 6.99 (br s, 2 H, NH_2), 7.38 (d, 2 H, Ar-H), 7.95 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = -5.4 (3 CH_3), -4.9, (3 CH_3), 18.2 (2 CH_3), 18.5 (2 CH_3), 115.2 (Ar-CH), 122.5 (Ar- C_q), 130.9 (Ar-CH), 157.8 (C-OH), 161.6 (C=N).

$^{15}\text{N-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 138.2 (NH, $^1J_{\text{NH}} = 80$ Hz), 292.1 (=N).

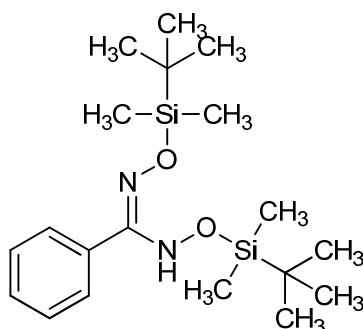
$^{29}\text{Si-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 27.43, 30.10.

MS (ESI): $m/z = 397$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}_2$ (395.23)

Ber. C 57.53 H 9.15 N 7.06

Gef. C 57.85 H 9.54 N 6.66

7.1.2.11.3 *O,O'*-Bis(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28e**)

Zu 2 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (311 mg) in 10 ml DCM werden 4 mmol TBDPS-Hydroxylamin **42** (588 mg) gegeben. Der Ansatz wird 8 d bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 437 mg farbloses Öl (58 %) ¹¹⁶

DC: $R_f = 0.86$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : nach 5 Minuten blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3300, 2930, 2858, 1600, 1472, 1250, 837.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 0.08 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.23 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.84 (s, 9 H, 3 CH_3), 1.00 (s, 9 H, 3 CH_3), 7.32-7.39 (m, 3 H, Ar-H), 7.57-7.60 (m, 2 H, Ar-H), 7.96 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = -5.4 (3 CH_3), -4.9, (3 CH_3), 18.2 (2 CH_3), 18.5 (2 CH_3), 128.0 (Ar-CH), 129.3 (Ar-CH), 129.7 (*p*-Ar-CH), 131.0 (Ar- C_q), 161.3 ($\text{C}=\text{N}$).

$^{15}\text{N-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 142.6 (NH, $^1J_{\text{NH}} = 81$ Hz), 310.0 (=N).

$^{29}\text{Si-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 27.39, 29.59.

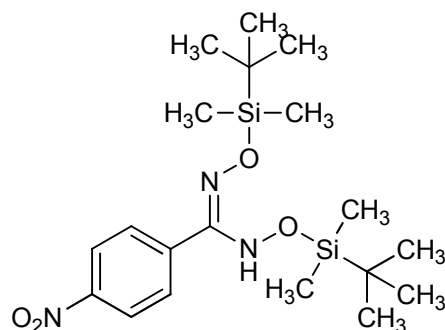
MS (ESI): $m/z = 381$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2\text{Si}_2$ (380.23)

Ber. C 59.95 H 9.53 N 7.36

Gef. C 59.58 H 9.20 N 7.22

7.1.2.11.4 *p*-Nitro-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**)



Es werden 16 mmol *p*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) (3.21 g) in 50 ml DCM mit 32 mmol TBDMS-Hydroxylamin **42** (4.70 g) versetzt. Der Ansatz wird über 7 d täglich für 11 Stunden auf 40-45 °C erwärmt und rührt über Nacht bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 5.12 g gelber Feststoff (75 %) ¹¹⁶

Schmp.: 97 °C

DC: $R_f = 0.83$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : nach 5 Minuten blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3294, 3076, 2931, 2858, 1518, 1350, 834.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 0.12 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.23 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.85 (s, 9 H, 3 CH_3), 0.98 (s, 9 H, 3 CH_3), 7.79 (d, 2 H, Ar-H), 7.94 (s, 1 H, NH), 8.22 (d, 2 H, Ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = -5.4$ (3 CH_3), -4.9 , (3 CH_3), 18.2 (2 CH_3), 18.5 (2 CH_3), 123.2 (Ar-CH), 130.0 (Ar-CH), 137.4 (Ar- C_q), 148.7 (C- NO_2), 159.2 (C=N).

^{15}N -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 141.3$ (NH, $^1J_{\text{NH}} = 80$ Hz), 317.1 (=N), 374.7 (NO_2).

^{29}Si -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 29.09$, 30.60 .

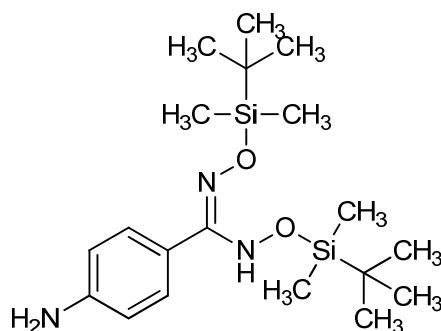
MS (ESI): $m/z = 425$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si}_2$ (425.22)

Ber. C 53.61 H 8.29 N 9.87

Gef. C 53.73 H 8.45 N 9.73

7.1.2.11.5 *p*-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**)



p-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) wird aus dem zuvor synthetisierten *p*-Nitro-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**) hergestellt.¹¹⁶

Zu einer Lösung aus 14.2 mmol *p*-Nitro-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28h**) (6.04 g) in 40 ml THF wird sehr langsam über zwei Stunden eine Lösung aus 11 Äquivalenten Natriumdithionit (156 mmol, 27.21 g) in 20 ml Wasser getropft. Der Ansatz wird weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit einem Gradienten aus Cyclohexan und Ethylacetat als Fließmittel.

Ausbeute: 1.29 g blassgelber Feststoff (23 %)¹¹⁶

Schmp.: 63 °C

DC: $R_f = 0.33$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : nach 5 Minuten blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3442, 3341, 3224, 2929, 2857, 1610, 1251, 828.

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 0.09$ (s, 6 H, 2 CH_3), 0.21 (s, 6 H, 2 CH_3), 0.87 (s, 9 H, 3 CH_3), 0.98 (s, 9 H, 3 CH_3), 5.29 (br s, 2 H, NH_2), 6.62 (d, 2 H, Ar-H), 7.40 (d, 2 H, Ar-H), 7.95 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = -5.4$ (3 CH_3), -4.9 , (3 CH_3), 18.3 (2 CH_3), 18.5 (2 CH_3), 114.3 (Ar-CH), 120.9 (Ar- C_q), 130.5 (Ar-CH), 148.0 (C- NH_2), 161.3 (C=N).

^{15}N -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 62.7$ (NH_2), 142.7 (NH , $^1J_{\text{NH}} = 80$ Hz), 306.6 ($=\text{N}$).

^{29}Si -NMR (CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 26.71$, 29.31 .

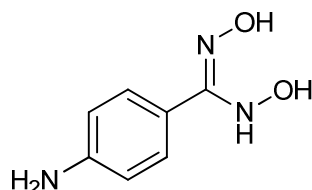
MS (ESI): $m/z = 396$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}_2$ (395.24)

Ber. C 57.67 H 9.43 N 10.62

Gef. C 58.02 H 9.73 N 10.64

7.1.2.12 Synthese von *p*-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin



p-Amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**9a**) wird entweder aus *p*-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) oder aus *p*-Amino-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) durch Abspaltung der Schutzgruppen hergestellt.¹¹⁶

Methode A:

Die Abspaltung der Schutzgruppen wird in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von Zhang *et al.* [1992], allerdings ohne Erhitzen, durchgeführt.¹¹⁵

Zu einer Lösung aus 3.16 mmol *p*-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) (1.25 g) in 10 ml Methanol wird eine Lösung aus 13 Äquivalenten Ammoniumfluorid (41.14 mmol, 1.52 g) in 10 ml Methanol hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Verschwinden von *p*-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**28a**) mittels Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) verfolgt. Das Produkt **9a** erscheint Nahe der Grundlinie auf der DC-Platte und färbt sich blau mit 2 %iger wässriger Eisen(III)chloridlösung. Nach 30 Minuten wird das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Unlösliche Bestandteile werden abfiltriert und das Filtrat für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen. Das Produkt **9a** wird mit einem Fließmittelgradienten aus Dichlormethan/Methanol eluiert. Das so erhaltene Rohprodukt **9a** wird mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 angerieben und lösliche Bestandteile werden mit Vakuum abgesaugt.

Methode B:

Die Abspaltung der Schutzgruppen findet in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von Corey *et al.* [1978] statt.¹¹³

Zu einer Lösung aus 0.773 mmol *p*-Amino-*O,O'*-bis(tetrahydropyran-2-yl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**27a**) (259 mg) in 10 ml Methanol wird langsam über eine Stunde eine Lösung aus zwei Äquivalenten *p*-Tosylsulfonsäure-Monohydrat (PTSA) (1.55 mmol, 294 mg) in 5 ml Methanol getropft. Der Reaktionsansatz rührt über Nacht bei Raumtemperatur und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Aufarbeitung wird analog zu Methode A durchgeführt.

Ausbeute: 215 mg hellgelber Feststoff (41 %) (Methode A)¹¹⁶

14 mg hellgelber Feststoff (11 %) (Methode B)¹¹⁶

Schmp.: 127 °C

DC: $R_f = 0.29$ (Dichlormethan/Methanol, 9:1; FeCl_3 : blau)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3403, 3332, 3068, 2789, 1611, 1526, 1380, 1271, 827.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 5.27 (br s, 2 H, NH_2), 6.51 (d, 2 H, Ar-H), 7.25 (d, 2 H, Ar-H), 7.96 (br s, 1 H, NH), 8.24 (s, 1 H, (NH)OH), 9.94 (s, 1 H, (=NO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 112.9 (Ar-CH), 119.0 (Ar- C_q), 128.7 (Ar-CH), 149.5 (C- NH_2), 157.4 (C=N).

$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 61.8 (NH_2), 127.5 (NH), 294.8 (=N).

MS (ESI): m/z = 168 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 151 $[\text{M} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$, 133 $[\text{M} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, 119 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{NH}_2 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

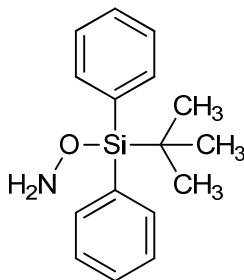
$\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 0.1 \text{ CH}_4\text{O}$ (170.37)

Ber. C 50.05 H 5.56 N 24.66

Gef. C 50.23 H 5.55 N 24.67

7.1.2.13 Synthese von *para*-substituierten *O,O'*-Di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidinen

7.1.2.13.1 *O-tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin (45)

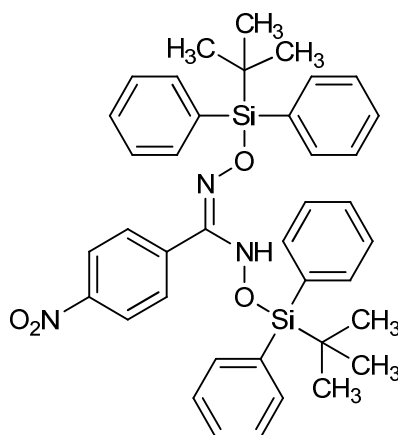


Die Verbindung wird nach Literaturvorschrift aus Hydroxylaminhydrochlorid, Triethylamin und *tert*-Butyldiphenylchlorsilan (**44**) in Dichlormethan unter Argon-Begasung hergestellt.¹³³

Ausbeute: 17.034 g weißer kristalliner Feststoff (79 %) (Lit.: 45 %)¹³³

Schmp.: 91 °C (Lit.: 87-89 °C)¹³³

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹³³

7.1.2.13.2 *p*-Nitro-*O,O'*-bis(*tert*-butyldiphenylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (33h)

Es werden 8 mmol *para*-Nitrobenzhydroxamsäurechlorid (**18h**) (1.604 g) in Dichlormethan fein suspendiert. Der Ansatz wird mit 16 mmol *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin **45** in einer Portion versetzt und auf 40-45 °C gebracht. Bei täglichem 10-stündigem Erhitzen unter Rückfluss wird die Reaktion nach 4 Tagen abgebrochen. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit reinem Cyclohexan als mobile Phase. Das bei der Flashchromatographie mit Cyclohexan/Ethylacetat ebenfalls anfallende monosubstituierte *p*-Nitro-*O-tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin kann isoliert und erneut 5 Tage lang mit *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxylamin **45** umgesetzt werden, um die Ausbeute zu erhöhen.

Ausbeute: 3.52 g gelbes Öl (65 %)

DC: $R_f = 0.80$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : nach 10 Minuten blau)

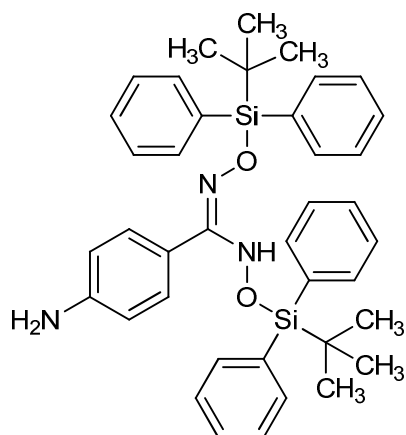
IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3073, 3051, 2930, 2857, 1590, 1428, 1114, 926, 697.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 1.02 (s, 9 H, 3 CH_3), 1.04 (s, 9 H, 3 CH_3), 7.25-7.52 (m, 14 H, 12 TBDPS-Ar-H, 2 Ar-H), 7.58-7.63 (m, 4 H, TBDPS-Ar-H), 7.65-7.70 (m, 4 H, TBDPS-Ar-H), 8.00-8.05 (d, 2 H, Ar-H), 8.38 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 18.9 ($\text{C}((\text{CH}_3)_3)$), 19.4 ($\text{C}((\text{CH}_3)_3)$), 27.0 (3 CH_3), 27.1 (3 CH_3), 122.8 (Ar-CH), 127.7 (TBDPS-Ar-CH), 128.0 (TBDPS-Ar-CH), 128.1 (TBDPS-Ar-CH), 130.6 (Ar-CH), 131.3 (TBDPS-Ar- C_q), 133.0 (TBDPS-Ar- C_q), 134.0 (TBDPS-Ar- C_q), 134.4 (TBDPS-Ar-CH), 135.4 (TBDPS-Ar-CH), 136.0 (TBDPS-Ar-CH), 136.5 (Ar- C_q), 148.3 (Ar- $\text{C}_q\text{-NO}_2$), 159.2 ($\text{C}=\text{N}$).

MS (ESI): m/z = 672 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.

HRMS (m/z): berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 674.2864, gefunden: 674.2865.

7.1.2.13.3 *p*-Amino-*O,O'*-bis(*tert*-butyldiphenylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**33a**)

Es werden 3.80 mmol *para*-Nitro-*O,O'*-bis(*tert*-butyldiphenylsilyl)-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**33h**) (2.56 g) in 15 ml Tetrahydrofuran unter Rühren gelöst. 10 Äquivalente Natriumdithionit (38.0 mmol, 6.62 g) werden in wenig Wasser gelöst und sehr langsam über eine Stunde zu der THF-Lösung getropft. Nach weiteren 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf Wasser gekippt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gradienten als mobile Phase.

Ausbeute: 1.39 g gelbes Öl (57 %)

DC: R_f = 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl_3 : nach 10 Minuten blau)

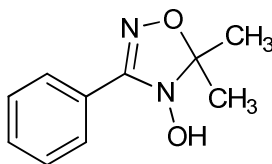
IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3389, 3072, 3050, 2931, 2858, 1621, 1428, 1113, 697.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 0.98 (s, 9 H, 3CH_3), 1.05 (s, 9 H, 3CH_3), 3.67 (br s, 2 H, NH_2), 6.45-6.49 (d, 2 H, Ar-H), 7.19-7.47 (m, 14 H, 12 TBDPS-Ar-H, 2 Ar-H), 7.60, 7.63 (m, 4 H, TBDPS-Ar-H), 7.68-7.71 (m, 4 H, TBDPS-Ar-H), 8.34 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ/ppm = 19.0 ($\text{C}((\text{CH}_3)_3)$), 19.4 ($\text{C}((\text{CH}_3)_3)$), 27.0 (3CH_3), 27.1 (3CH_3), 113.9 (Ar-CH), 120.2 (Ar- C_q), 127.5 (TBDPS-Ar-CH), 127.9 (TBDPS-Ar-CH), 129.5 (TBDPS-Ar-CH), 130.2 (TBDPS-Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 131.9 (TBDPS-Ar- C_q), 133.7 (TBDPS-Ar- C_q), 135.4 (TBDPS-Ar-CH), 136.0 (TBDPS-Ar-CH), 147.7 (C- NH_2), 160.9 (C=N).

MS (ESI): m/z = 644 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

HRMS (m/z): berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 644.3118, gefunden: 644.3123.

7.1.2.14 Synthese von cyclischen *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen7.1.2.14.1 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (**13d**)

Es werden 5 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (778 mg) in 5 ml Aceton gelöst und mit 3 Löffeln Molekularsieb 4 Å versetzt. Nach Kühlung durch Eis-Wasser werden unter Rühren 15 mmol Hydroxylamin als freie Base zugegeben. Der Ansatz wird 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine deutliche Farbveränderung von hellgelb bis hin zu dunkelrot kann beobachtet werden. Eine zu lange Reaktionszeit resultiert in der Zersetzung des Produktes, erkennbar an der Entfärbung des Ansatzes. Die festen Bestandteile werden durch Filtration entfernt. Das Filtrat wird bei maximal 30 °C eingeeengt und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Eine weitere Flashchromatographie mit reinem Dichlormethan erhöht die Reinheit des Produktes **13d**. Die Verbindung **13d** wird bei -18 °C gelagert.

Ausbeute: 259 mg weißer Feststoff (27 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 130 °C (Lit.: 120-122 °C) ⁷⁹

DC: $R_f = 0.38$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : rot)

$\log D$: 1.4 (ber. $\log D = 1.84$) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3220, 2984, 2933, 2856, 1695, 1596, 1449, 1352, 1216, 920, 824.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 1.45 (s, 6 H, 2 CH_3), 7.48 (m, 3 H, Ar-H), 7.79 (m, 2 H, Ar-H), 9.36 (s, 1 H, (NRO)H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 22.2 (CH_3), 101.0 (C-5), 126.4 (Ar-C-1), 127.1 (Ar-C-2), 128.6 (Ar-C-3), 130.4 (Ar-C-4), 158.8 (C-3).

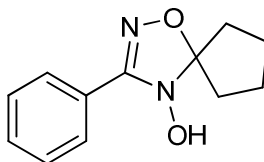
$^{15}\text{N-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 161.4 (-NROH), 324.0 (=NOR).

MS (ESI): m/z = 193 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 177 $[\text{M} - \text{CH}_4 + \text{H}]^+$, 135 $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}]^+$, 117.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.1 \text{ EtOAc}$ (201.03)

Ber. C 62.14 H 6.42 N 13.93

Gef. C 62.51 H 6.34 N 14.08

7.1.2.14.2 4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.4]non-2-en (**13i**)

Es werden 2 mmol *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) (304 mg) in 5 ml Cyclopentanon unter Rühren gelöst. Die Lösung wird 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wird eine Farbveränderung von farblos zu dunkelrot beobachtet. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (Cyclohexan/Ethylacetat 7:3; FeCl₃ verfärbt das Produkt **13i** rot). Eine zu lange Reaktionszeit resultiert in der Zersetzung des Produktes **13i**, erkennbar an der Entfärbung des Ansatzes. Das Produkt **13i** wird unter hohem Vakuum bei Raumtemperatur über 24 h vom Lösungsmittel befreit und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindung **13i** wird bei -18 °C gelagert.

Ausbeute: 105 mg weißer Feststoff (24 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 133 °C

DC: R_f = 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: rot)

log*D*: 2.8 (ber. log*D* = 2.42) ¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3220, 2971, 2943, 2876, 2828, 1595, 1568, 1449, 1349, 951, 918.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.77 (m, 6 H, 3 -CH₂-), 2.13 (m, 2 H, -CH₂-), 7.48 (m, 3 H, Ar-H), 7.80 (m, 2 H, Ar-H), 9.50 (s, 1 H, (NRO)H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 23.2 (C-5, C-8), 32.8 (C-6, C-7), 111.1 (C-9), 126.3 (Ar-C-1), 127.1 (Ar-C-2), 128.6 (Ar-C-3), 130.5 (Ar-C-4), 159.4 (C-3).

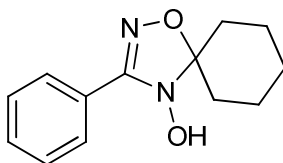
¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 158.3 (-NROH), 328.6 (=NOR).

MS (ESI): m/z = 219 [M + H]⁺, 135 [C₇H₇N₂O]⁺, 117.

C₁₂H₁₄N₂O₂ (218.26)

Keine Elementaranalyse, da Probe flüchtig ist.

7.1.2.14.3 4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.5]dec-2-en (**13k**)



Es werden 2 mmol *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (**9e**) (304 mg) in 5 ml Cyclohexanon unter Rühren gelöst. Die Lösung wird 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wird eine Farbveränderung von farblos zu dunkelrot beobachtet. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (Cyclohexan/Ethylacetat 7:3; FeCl₃ verfärbt das Produkt **13k** rot). Eine zu lange Reaktionszeit resultiert in der Zersetzung des Produktes **13k**, erkennbar an der Entfärbung des Ansatzes. Das Produkt **13k** wird unter hohem Vakuum bei Raumtemperatur über 24 h vom Lösungsmittel befreit und für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient). Die Verbindung **13k** wird bei -18 °C gelagert.

Ausbeute: 353 mg weißer Feststoff (76 %)¹⁵⁸

Schmp.: 72 °C

DC: R_f = 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: rot)

log*D*: 1.3 (ber. log*D* = 2.86)¹¹⁹

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3201, 2934, 2862, 1694, 1571, 1448, 1357, 1114, 938, 876.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.67 (m, 10 H, 5 -CH₂-), 7.46 (m, 3 H, Ar-H), 7.82 (m, 2 H, Ar-H), 9.29 (s, 1 H, (NRO)H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 23.0 (C-5, C-9), 24.6 (C-7), 31.3 (C-6, C-8), 101.7 (C-10), 126.8 (Ar-C-1), 127.2 (Ar-C-2), 128.7 (Ar-C-3), 130.5 (Ar-C-4), 158.9 (C-3).

¹⁵N-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 159.0 (-NROH), 326.7 (=NOR).

MS (ESI): m/z = 233 [M + H]⁺, 135 [C₇H₇N₂O]⁺, 117.

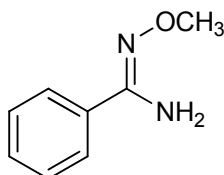
C₁₃H₁₆N₂O₂ (232.28)

Ber. C 67.22 H 6.94 N 12.06

Gef. C 67.22 H 6.82 N 12.15

7.1.2.15 Synthese von *O*-substituierten Benzamidoximen

7.1.2.15.1 *O*-Methylbenzamidoxim (72)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an Johnson *et al.* [1980].¹⁵¹

Es werden 5 mmol Dimethylsulfat (477 μ l) tropfenweise bei 0 °C zu einer Lösung aus 5.35 mmol Natriumhydroxid (214 mg) und 4.74 mmol Benzamidoxim (**14**) (645 mg) in 8 ml Wasser gegeben. Der Ansatz rührt 8 h bei 0 °C. Das Wasser wird evaporiert und der Rückstand für die Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf Kieselgel aufgezogen (Feste Phase: Kieselgel; Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat als Gradient).

Ausbeute: 320 mg erstarrtes klares Öl (45 %) (Lit.: 81 %)¹⁵¹

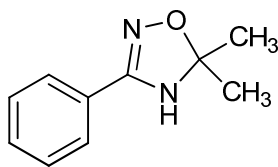
Schmp.: 59 °C (Lit.: 54-55 °C)¹⁵¹

DC: R_f = 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: hellbraun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁵¹

MS (ESI): m/z = 151 [M + H]⁺.

7.1.2.15.2 5,5-Dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (73)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an Lessel *et al.* [1993].¹⁵²

Es werden 500 mg Benzamidoxim (**14**) (3.68 mmol) in 10 ml Eisessig gelöst und mit 822 μ l Aceton (14.9 mmol, 4 eq) versetzt. Die Lösung wird auf 50 °C erhitzt und das Fortschreiten der Reaktion mittels DC verfolgt. Nach 4 h wird auf Raumtemperatur gekühlt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird auf Kieselgel aufgezogen und mittels Flashchromatographie aufgereinigt.

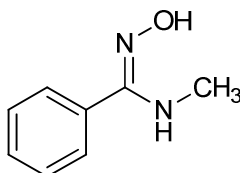
Ausbeute: 32 mg weiße Nadeln (5 %) (Lit.: 70 %)¹⁵²

Schmp.: 136 °C (Lit.: 134 °C)¹⁵²

DC: R_f = 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl_3 : hellbraun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁵²

MS (ESI): m/z = 177 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

7.1.2.16 Synthese von *N*-substituierten Benzamidoximen7.1.2.16.1 *N*-Methylbenzamidoxim (74a)

Die Verbindung wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Thiyapong *et al.* hergestellt.¹⁵³

Es werden 13 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (2.02 g) in 20 ml Ethanol gelöst und im Eisbad auf 0 °C gebracht. Unter Rühren werden langsam bei 0 °C 1.5 ml wässriges 40 %iges Methylamin, gelöst in 10 ml Ethanol und 2 ml Triethylamin, zugegeben. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wird das organische Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand mit 50 ml Wasser versetzt und dreimal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 20 ml Chloroform versetzt, mit *n*-Hexan pulverisiert und über Nacht im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 695 mg feine weiße Nadeln (36 %) (Lit.: 80 %)¹⁵³

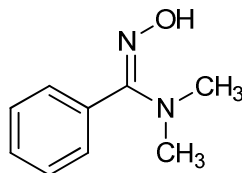
Schmp.: 167 °C (Lit.: 162-163 °C)¹⁵³

DC: R_f = 0.11 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl_3 : orange)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁵³

MS (ESI): $m/z = 151$ $[M + H]^+$.

7.1.2.16.2 *N,N*-Dimethylbenzamidoxim (74c)



Die Verbindung wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Plapinger *et al.* hergestellt.¹⁵⁷

Es werden 10 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (1.55 g) in 3 ml absolutem Ethanol gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren wird bei 0 °C eine Lösung aus 220 mmol Dimethylamin (1,48 ml) in 4 ml absolutem Ethanol zugegeben. Nach 24 h wird ein Teil des Ethanols evaporiert, der Rückstand abgekühlt und filtriert. Der Rückstand wird mit eiskaltem absolutem Ethanol gewaschen und in Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 440 mg weißes Pulver (27 %)

Schmp.: 126 °C (Lit.: 120 °C)¹⁵⁷

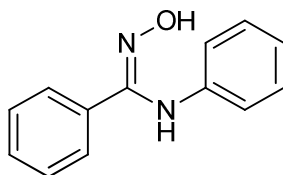
DC: $R_f = 0.20, 0.25$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; $FeCl_3$: orange)

1H -NMR ($DMSO-d_6$): $\delta/ppm = 2.56$ (s, 6 H, 2 CH_3), 7.27-7.45 (m, 5 H, Ar-H), 9.12 (s, 1 H, OH).

^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$): $\delta/ppm = 39.1$ (CH_3), 128.0 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 132.1 (Ar- C_q), 158.9 (Ar-CNN).

MS (ESI): $m/z = 165$ $[M + H]^+$.

7.1.2.16.3 *N*-Phenylbenzamidoxim (74b)



Die Verbindung wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Sielecki-Dzurdz [2010] hergestellt.¹⁵⁴

Es werden 10 mmol Benzhydroxamsäurechlorid (**18e**) (1.56 g) in 60 ml Diethylether gelöst. Unter Rühren werden 100 mmol Anilin (9.12 ml) hinzugefügt und anschließend 10 mmol Triethylamin (1.38 ml) über 5 Minuten zugetropft. Der Ansatz wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert, der Rückstand mit 50 ml Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethanphase wird mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol und anschließend Cyclohexan/Ethylacetat).

Ausbeute: 1.29 g beiges Pulver (61 %) (Lit.: 45 %) ¹⁵⁴

Schmp.: 134 °C (Lit.: 136-137 °C) ²²⁸

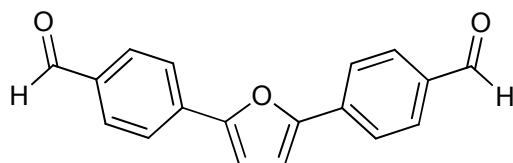
DC: R_f = 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat, 7:3; FeCl₃: braun)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ²²⁸

MS (ESI): m/z = 213 [M + H]⁺.

7.1.2.17 Synthese von 2,5-disubstituierten Furanen

7.1.2.17.1 Synthese von 2,5-Bis(4-formylphenyl)furan (**77**)



Die Synthese wird in Anlehnung an die Literatur von Fu *et al.* [2011] durchgeführt. ¹⁵⁹

Zu 20 mmol *para*-Brombenzaldehyd (**16f**) (3.7 g), gelöst in Dimethylacetamid werden 16.57 mmol Furan (1200 µl), 71 mmol Kaliumacetat (7 g) und 0.2 mmol Palladium(II)acetat (44 mg) gegeben. Die Lösung wird mit Argon begast und geschlossen auf 130-140 °C für 6 Stunden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Feststoff durch Absaugen abgetrennt und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum bei 65 °C evaporiert, der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen und das Rohprodukt **77** mittels Flashchromatographie über Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat als Gradienten aufgereinigt. Das Produkt zeigt eine stark ausgeprägte auffällige Fluoreszenz.

Ausbeute: 2.559 g gelbes Pulver (46 %)

Schmp.: 171 °C

DC: R_f = 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; blaue Eigenfluoreszenz bei λ = 366 nm)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3007, 2985, 2915, 2317, 1986, 1689, 1601, 1210, 1159, 1060, 788.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.42 (s, 2 H, Furan-H), 7.97-8.00 (d, 4 H, Ar-H), 8.06-8.09 (d, 4 H, Ar-H), 10.01 (s, 2 H, CHO).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 111.9 (Furan-CH), 124.1 (Ar-CH), 130.3 (Ar-CH), 134.7 (C_q), 135.0 (C_q), 152.8 (C_q), 192.3 (CHO).

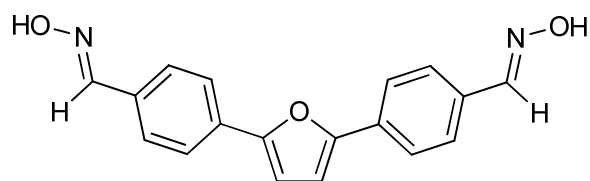
MS (ESI): m/z = 277 [M + H]⁺.

C₁₈H₁₂O₃ (276.08)

Ber. C 78.25 H 4.38

Gef. C 78.31 H 4.56

7.1.2.17.2 Synthese von 2,5-Bis(4-hydroxyaminophenyl)furan (78)



Zu 9.27 mmol 2,5-Bis(4-formylphenyl)furan (**77**) (2.559 g), fein suspendiert in Ethanol, werden 2.46 Äquivalente Hydroxylaminhydrochlorid (23.08 mmol, 1.604 g) und 1.03 Äquivalente Kaliumcarbonat (9.61 mmol, 1.326 g) in Form einer gesättigten Lösung in Wasser nach und nach zugegeben. Die Suspension wird auf 75 °C unter Rückfluss für eine Stunde erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Ethanol evaporiert und der wässrige Rückstand mit zusätzlichem Wasser versetzt. Es wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand **78** ist rein und ohne weitere Aufarbeitung verwendbar.

Ausbeute: 2.808 g gelbes Pulver (99 %)

Schmp.: 239 °C

DC: R_f = 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:4; FeCl_3 : braun; blaugrüne Eigenfluoreszenz bei λ = 366 nm)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3015, 2977, 2915, 2321, 1981, 1691, 1605, 1405, 1217, 1067, 968, 796.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 7.17 (s, 2 H, Furan-H), 7.66-7.68 (d, 4 H, Ar-H), 7.84-7.87 (d, 4 H, Ar-H), 8.16 (s, 2 H, CH(NOH)), 11.29 (s, 2 H, NOH).

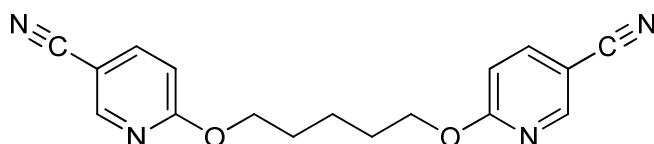
$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 109.2 (Furan-CH), 123.7 (Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 130.5 (C_q), 132.2 (C_q), 147.7 (CH(NOH)), 152.5 (C_q).

MS (ESI): m/z = 307 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

HRMS (m/z): berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ [$\text{M} + 1$] $^+$ = 307.1083, gefunden: 307.1077.

7.1.2.18 Synthese von heterocyclischen Pentamidinanaloga

7.1.2.18.1 Synthese von 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-cyanopyridin (82)



Es werden 6.8 mmol 1,5-Pentandiol (0.70 g) in 50 ml trockenem THF unter Rühren gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dazu werden 18.4 mmol Natriumhydrid (2.7 eq, 0.73 g) als 60 %ige Dispersion in Mineralöl gegeben und 20 min lang bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Zu dem Ansatz werden eine Spatelspitze Kaliumiodid und 14.26 mmol 2-Brom-5-cyanopyridin **81** (2.1 eq, 2.61 g), vorgelöst in 50 ml trockenem THF, in einer Portion bei 0 °C zugegeben und einen Tag bei Raumtemperatur

gerührt. Nach Verdünnung der Suspension mit Dichlormethan werden die Feststoffe durch Filtration entfernt und das Filtrat über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird evaporiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten aufgereinigt.

Ausbeute: 650 mg weißes Pulver (32 %) (Lit.: 83 %) ¹⁵

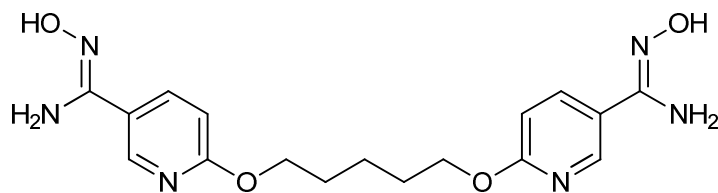
Schmp.: 174 °C (Lit.: 165-166 °C) ¹⁵

DC: $R_f = 0.30$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ¹⁵

MS (ESI): $m/z = 331$ $[M + Na]^+$, 309 $[M + H]^+$.

7.1.2.18.2 Synthese von 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-N-hydroxyamidinopyridin (83)



2.09 mmol 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-cyanopyridin (**82**) (0.65 g) und 21 mmol Hydroxylamin (10 eq, 0.71 g) werden in 75 ml Ethanol/Wasser (9+1) für acht Stunden unter Rückfluss gekocht. Der Ansatz wird erhitzt, bis sich ein weißer Niederschlag gebildet hat. Nach vollständigem Erkalten der Reaktionslösung wird das Präzipitat abfiltriert und mit Wasser und kaltem Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Rohprodukt dreimal aus Ethanol und final aus Methanol umkristallisiert. Der erhaltene weiße Feststoff wird 24 Stunden am Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 360 mg weißes Pulver (46 %)

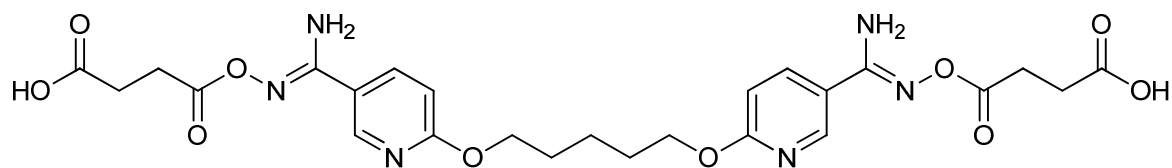
Schmp.: 199 °C (Lit.: 197-200 °C) ¹⁵

DC: $R_f = 0.24$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. ¹⁵

MS (ESI): $m/z = 397$ $[M + Na]^+$, 375 $[M + H]^+$.

7.1.2.18.3 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-N-(3-carboxypropionyloxy)-amidinopyridin (84)



0.09 mmol 2,2'-Pentamethyldioxy-bis-5,5'-N-hydroxyamidinopyridin (**83**) (320 mg) werden unter Rückfluss in 25 ml Ethanol erhitzt, bis es sich vollständig gelöst hat. Eine Lösung aus 0.9 mmol Bernsteinsäureanhydrid (10 eq, 90 mg) in 25 ml Dichlormethan wird unter Rühren zugetropft und der

Ansatz für weitere vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert, viermal in DCM suspendiert und jeweils abfiltriert. Abschließend wird der weiße Feststoff mit Diethylether gewaschen und 24 Stunden unter Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 540 mg (91 %)

Schmp.: 179 °C

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3467, 3374, 2971, 2942, 1738, 1699, 1625, 1614, 1346, 1162, 883, 843.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 1.46-1.61 (m, 2 H, CH₂), 1.71-1.86 (m, 4 H, 2 CH₂), 2.51-2.60 (m, 4 H, 2 CH₂), 2.62-2.74 (m, 4 H, 2 CH₂), 4.24-4.38 (t, 4 H, 2 CH₂), 6.84 (br s, 4 H, 2 NH₂), 6.87 (d, 2 H, Ar-C₃, ³J = 8.8 Hz), 7.96 (dd, 2 H, Ar-C₄, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.3 Hz), 8.48 (d, 2 H, Ar-C₆, ⁴J = 2.1 Hz), 12.25 (br s, 2 H, OH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ /ppm = 22.1 (CH₂), 27.8 ((COO)CH₂), 28.1 (CH₂), 28.7 (CH₂(COOH)), 65.8 (OCH₂), 110.3 (Ar-CH), 120.9 (Ar-C_q), 137.5 (Ar-CH), 145.5 (Ar-CH), 154.6 (C(=NOR)NH₂), 164.7 (Ar-C_q), 170.2 (COOR), 173.6 (COOH).

MS (ESI, neg. Modus): m/z = 573 [M - H]⁻, 555 [M - H₂O - H]⁻, 473 [M - C₄H₄O₃ - H]⁻, 455 [M - C₄H₄O₃ - H₂O - H]⁻.

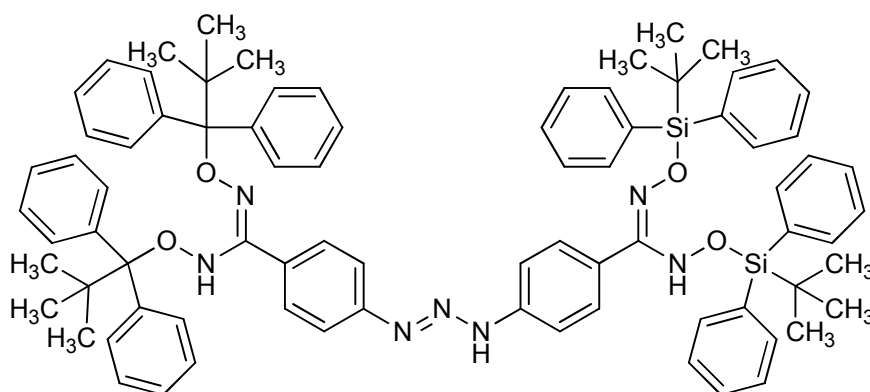
C₂₅H₃₀N₆O₁₀·0.2 NH₃ (577.96)

Ber. C 51.96 H 5.31 N 15.03

Gef. C 52.20 H 5.31 N 15.23

7.1.2.19 Synthese von Diminazen-Derivaten

7.1.2.19.1 Synthese von 1,3-Bis(4,4'-(*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl)-*N,N'*-dihydroxyamidino)phenyl)triazen (94)



Es werden 4.44 mmol *p*-Amino-*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**33a**) (2.85 g) mit einer Lösung aus 3.5 ml konzentrierter HCl und 40 ml Wasser und 10 g Eis versetzt. Zu dem Ansatz werden langsam 155 mg Natriumnitrit in 10 ml Wasser unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird mit 1.0 g Natriumacetat in 9 ml Wasser gepuffert und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Löslichkeitsverbesserung von *p*-Amino-BDHA2OTBDPS **33a** werden

20 ml Dichlormethan zugesetzt und weitere 20 Minuten kräftig gerührt. Nach Abtrennung der organischen Phase wird der wässrige Rückstand dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, und Brine gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das organische Lösungsmittel wird im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand schwerkraftsäulenchromatographisch über Kieselgel mit einer mobilen Phase aus Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 1.037 g gelbes Pulver (18 %)

Schmp.: 106 °C

DC: $R_f = 0.58$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2; FeCl_3 : nach 2 Stunden blaugrün)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3072, 2930, 2857, 1609, 15525, 1428, 1242, 1114, 920, 821, 697.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 0.97 (d, 36 H, 4 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 7.29-7.70 (m, 48 H, Ar-H), 12.66 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 18.6 ($\text{C}_q(\text{CH}_3)$), 18.8 ($\text{C}_q(\text{CH}_3)$), 26.7 ($(\text{C}_q)\text{CH}_3$), 113.2 (Ar-CH), 120.2 (Ar- C_q), 127.6 (Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 129.9 Ar-CH), 130.3 (Ar-CH), 131.2 (Ar-CH), 133.0 (Ar- C_q), 134.8 (Ar-CH), 135.4 (Ar-CH), 141.5 (Ar- C_q), 160.1 (Ar- C_q).

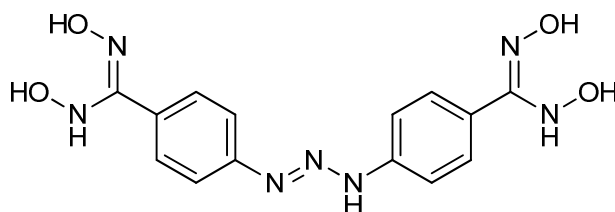
Die Massenspektrometrie und die Hochauflösende Massenspektrometrie für diese Verbindung waren nicht erfolgreich, da die Verbindung eine sehr hohe Lipophilie besitzt und bei der vorangehenden HPLC-Trennung vermutlich auf der Säule verbleibt. Die massenspektrometrische Direktmessung der lieferte ebenfalls kein Ergebnis. Vermutlich sind die Schwierigkeiten in der Detektion den Moleküleigenschaften zuzuordnen.

$\text{C}_{80}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_4\text{Si}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1337.68)

Ber. C 71.77 H 7.15 N 7.32

Gef. C 72.19 H 7.41 N 7.03

7.1.2.19.2 Synthese von 1,3-Bis(4,4'-(*N,N'*-dihydroxyamidino)phenyl)triazen (92)



Es werden 0.308 mmol 1,3-Bis(4,4'-(*O,O'*-di-*tert*-butyldiphenylsilyl)-*N,N'*-dihydroxyamidino)phenyl)-triazene (**94**) (400 mg) in 30 ml Dichlormethan gelöst und im Gefrierfach auf -18 °C abgekühlt. Dazu wird eine Lösung aus 4 Äquivalenten Ammoniumfluorid (46 mg; 1.23 mmol) in 5 ml Methanol gegeben und der Ansatz über 20 h bei -18 °C belassen. Die organischen Lösungsmittel wurden bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt und das Rohprodukt bis zur weiteren Behandlung bei -18 °C eingefroren. Für die Flashchromatographie wird der Rückstand in Ethylacetat/Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgezogen und unmittelbar mit Cyclohexan/Ethylacetat und einem scharfen Gradienten chromatographiert. Die vereinten Fraktionen werden bei Raumtemperatur vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Dichlormethan angerieben und abgesaugt. Es verbleibt ein gelbes Pulver.

Ausbeute: 40 mg gelbes Pulver (37 %)

Schmp.: 159 °C

DC: $R_f = 0.28$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:3; FeCl_3 : blaugrün)

IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 3186, 2933, 1639, 1607, 1526, 1389, 1255, 1170, 929, 835.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 7.32-7.67 (m, 8 H, Ar-H), 7.80 (s, 1 H, NH), 8.21 (s, 2 H, NH(OH)), 8.44 (s, 2 H, (NH)OH), 10.33 (s, 2 H, =NOH).

HRMS (m/z): berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 346.1260$, gefunden: 346.1258.

7.2 Stabilität

7.2.1 Geräte und Materialien

Chemikalien

Acetonitril, Methanol (Fa. J.T. Baker, Griesheim), Ameisensäure, Kaliumhydroxid, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), Dimethylsulfoxid (Fa. Roth, Karlsruhe), Natriumoctylsulfonat (Fa. TCI, Tokyo)

Verbrauchsmaterialien

Whatman™ Polyamid Membranfilter (0.45 μm) (GE Healthcare Life Science, Freiburg), Reaktionsgefäße 1.5 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Geräte

Die Proben wurden mit dem Kleinschüttler IKA-VF2 (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) in Lösung gebracht. Große Probenmengen wurden auf dem Vibrationsmischer IKA Vibrax-VXR (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden mit der Hettich Mikroliter Zentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Inkubationsbedingungen von 37 °C wurden in dem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) erreicht. PH-Werte wurden mit Hilfe des pH-Meter CG840 (Fa. Schott Instruments, Mainz) mit der pH-Elektrode SenTix 21 (Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) bestimmt. Fließmittel wurden mit dem Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 106 (Fa. Otto E. Kobe KG, Marburg) entgast.

7.2.2 Vorbereitung der Proben

Etwa 1 mg der Verbindungen *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA **9e**), *O*-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHAOMe **31/31'e**), *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (BDHAAce **13d**) wurden zu 50 μl DMSO gegeben. Dazu wurden 950 μl 100 mM Phosphatpuffer der pH-Werte 2.0, 6.3, 7.4 und 9.0 pipettiert, 1 Minute gevortext und 3 Minuten zentrifugiert. Je 800 μl Überstand wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Je 50 μl Probe wurden nach 0, 5, 20, 40, 60, 90, 120 Minuten gezogen, mit 50 μl Acetonitril/1 % Ameisensäure verdünnt und geschüttelt und zweimal mittels HPLC vermessen.

7.2.3 HPLC-Analytik zur Trennung möglicher Zersetzungsprodukte der Dihydroxybenzamidine

Die Analytik erfolgte mit einem Waters HPLC-System mit binärer Waters 600 Pumpe, Waters 600 E System Controller, Waters 717 plus Autosampler, Waters 2487 Dual λ Absorptionsdetektor, Knauer Entgaser und der EZ Chrom Elite Auswertsoftware.

Methode A:

Säule:	Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 50 mm, 2.7 μ m) (Fa. Agilent, USA) mit Phenomenex C18 Vorsäule (AJ0-8775)
Mobile Phase:	A: 95 % (v/v) 10 mM Na-Octylsulfonat, pH 2.5 + 5 % Acetonitril B: Acetonitril
Fließmittelgradient:	0 – 5 min 100 – 78 % A, 0 – 22 % B (linear) 5 – 40 min 78 % A, 22 % B (konstant) 40 – 45 min 78 – 100 % A, 22 – 0 % B (linear) 45 – 60 min 100 % A (konstant)
Flussrate:	0.4 ml/min
Laufzeit:	60 min
Detektion:	UV-Absorptionsmessung bei λ = 229 nm
Injektionsvolumen:	5 μ l
Retentionszeiten:	
Benzhydroxamsäure	1.6 min \pm 0.1 min
Benzamid	2.5 min \pm 0.1 min
Benzoessäure	3.1 min \pm 0.1 min
Benzonitril	16.9 min \pm 0.2 min
Benzaldoxim (17e)	19.2 min \pm 0.2 min
BDHA 9e	20.8 min \pm 0.1 min
BDHAOMe 31/31'e	21.8 min \pm 0.1 min
BDHA2OMe 30e	22.9 min \pm 0.1 min
BDHAAce 13d	23.2 min \pm 0.2 min
Dimer 64	35.2 min \pm 0.5 min

Methode B:

Säule:	Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 50 mm, 2.7 μ m) (Fa. Agilent, USA) mit Phenomenex C18 Vorsäule (AJ0-8775)
Mobile Phase:	92 % A: 95 % (v/v) 10 mM Na-Octylsulfonat, pH 2.5 + 5 % Acetonitril 8 % B: Acetonitril
Flussrate:	0.4 ml/min

Laufzeit:	33 min
Detektion:	UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 229$ nm
Injektionsvolumen:	5 μ l
Retentionszeiten:	
Benzamidoxim (14)	11.5 min \pm 0.1 min
BAOAce 73	12.6 min \pm 0.2 min
BAOMe 72	12.7 min \pm 0.2 min
Benzamidin (15)	14.4 min \pm 0.2 min
BDHA 9e	17.2 min \pm 0.1 min
BDHAOMe 31/31'e	18.9 min \pm 0.1 min
BDHA2OMe 30e	19.8 min \pm 0.1 min
BDHAAce 13d	20.0 min \pm 0.2 min

7.3 Löslichkeit

7.3.1 Geräte und Materialien

Chemikalien

Acetonitril (Fa. J.T. Baker, Griesheim), Ameisensäure, Kaliumhydroxid, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), Natriumoctylsulfonat (Fa. TCI, Tokyo)

Verbrauchsmaterialien

Whatman™ Polyamid Membranfilter (0.45 μ m) (GE Healthcare Life Science, Freiburg), Reaktionsgefäße 1.5 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Geräte

Die Proben wurden auf dem Vibrationsmischer IKA Vibrax-VXR (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden mit der Hettich Mikroliter Zentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. pH-Werte wurden mit Hilfe des pH-Meter CG840 (Fa. Schott Instruments, Mainz) mit der pH-Elektrode SenTix 21 (Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) bestimmt. Fließmittel wurden mit dem Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 106 (Fa. Otto E. Koby KG, Marburg) entgast.

7.3.2 Kalibrierung

Es wurde eine 11-Punkt-Kalibrierung im Bereich von 0.25–2000 μ M für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA, **9e**) in Acetonitril durchgeführt. Im Falle von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe, **30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (BDHAAce, **13d**) wurde eine 9-Punkt-Kalibrierung in Acetonitril im Bereich von 0.25–500 μ M vermessen. Die Kalibrierungen wurden doppelt pipettiert und je zweimal in die HPLC injiziert.

7.3.3 Vorbereitung der Proben

Für die Bestimmung der Löslichkeit wurde jeweils eine unlösliche Menge (ca. 2 mg) der Verbindungen BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** in 300 μ l 100 mM Phosphatpuffer der

pH-Werte 2.0, 6.3, 7.4 und 9.0 (eingestellt mit H_3PO_4 und KOH) unter Schütteln für 5 Minuten suspendiert. Es wurde kontrolliert, ob ein Rückstand zu sehen ist. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 22000 g wurden 50 μl des Überstandes mit 50 μl Acetonitril (mit 1 % Ameisensäure im Falle von BDHA **9e**) verdünnt. 10 μl der Verdünnung wurden zu 990 μl ACN pipettiert und die Lösung je zweimal mittels HPLC vermessen.

7.3.4 HPLC-Analytik zur Bestimmung pH-abhängiger Sättigungslöslichkeiten

Es wurde die HPLC-Analytik zur Trennung möglicher Zersetzungsprodukte der Dihydroxybenzamidine voneinander (siehe 7.2.3, Methode B) verwendet.

7.4 Lipophilie

7.4.1 Geräte und Materialien

Ammoniumformiat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), 25 %iger Ammoniak, Methanol (Fa. J.T. Baker, Griesheim), Dikaliumhydrogenphosphat (Fa. Roth, Karlsruhe). Die Standards Acetylpyridin, Acetanilid, Acetophenon, Benzoessäuremethylester, Benzoessäureethylester, Benzophenon, Benzoessäurephenylester, Diphenylether, Dibenzyl und Triphenylamin wurden von den Firmen Alfa-Aesar, Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Die Proben wurden mit dem Kleinschüttler Vortex Genie 2 der Firma Scientific Industries, Inc. suspendiert. Die pH-Werte wurden mit einem Microprozessor pH-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten (Weilheim) mit der Elektrode Blue Line 16 pH (Fa. Schott Instruments, Mainz) gemessen.

7.4.2 HPLC-Analytik zur Bestimmung von $\log D$ -Werten

Die Analytik erfolgte mit der Merck-Hitachi HPLC-Anlage mit L6200A Pumpensystem, AS-2000 Autosampler, L4000 UV-Detektor (Fa. Merck-Hitachi) und der Software ClarityLite 2.5.6.99 (Fa. DataApex).

Säule:	Waters X Terra MS C8 (4.6 × 50 mm, 3.5 μm Partikelgröße) mit C8 Phenomenex Vorsäule (3 × 2 mM)
Säulentemperatur:	30 °C
Mobile Phase:	A: 95 % (v/v) 25 mM Ammoniumacetat, pH 7.4 + 5 % Methanol B: 95 % (v/v) Methanol + 5 % 25 mM Ammoniumacetat, pH 7.4
Fließmittelgradient:	0 – 50 min 100 % A – 100 % B (linear)
Flussrate:	0.5 ml/min
Laufzeit:	50 min
Detektion:	UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 220 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 5 μ l

7.5 Bioaktivierungsuntersuchungen

7.5.1 Geräte und Materialien

Chemikalien

Acetonitril, Methanol (Fa. J.T. Baker, Griesheim), Ameisensäure, Benzamidin (**15**), Kaliumhydroxid, Natriumdithionit, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), Benzamidoxim (**14**) (eigene Herstellung), Dimethylsulfoxid (Fa. Roth, Karlsruhe), Natriumoctylsulfonat (Fa. TCI, Tokyo)

Verbrauchsmaterialien

Whatman™ Polyamid Membranfilter (0.45 μ m) (Fa. GE Healthcare Life Science, Freiburg), Reaktionsgefäße 1.5 ml, Microvetten (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Geräte

Die Proben wurden mit dem Kleinschüttler IKA-VF2 (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) in Lösung gebracht. Große Probenmengen wurden auf dem Vibrationsmischer IKA Vibrax-VXR (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) geschüttelt. Gefällte Proteine wurden mit der Hettich Mikroliter Zentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Inkubationsbedingungen von 37 °C wurden in dem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) erreicht. pH-Werte wurden mit Hilfe des pH-Meter CG840 (Fa. Schott Instruments, Mainz) mit der pH-Elektrode SenTix 21 (Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) bestimmt. Fließmittel wurden mit dem Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 106 (Fa. Otto E. Koby KG, Marburg) entgast. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und dem Add-in PKSolver 2.0 sowie mit SigmaPlot 11.0.

7.5.2 Inkubationen mit Cytochrom P450-Enzymquellen

7.5.2.1 Enzymquellen

Die Cytochrom P450-Isoenzyme 1A2 (spezifische Aktivität: 30 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2A6 (spezifische Aktivität: 11.1 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2B6 (spezifische Aktivität: 4.9 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2C8 (spezifische Aktivität: 5.4 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2C9*1 (spezifische Aktivität: 40.0 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2C19 (spezifische Aktivität: 3.4 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹), 2D6*1 (spezifische Aktivität: 46 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹) und 3A4 (spezifische Aktivität: 170 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹) inklusive coexprimierter NADH-Cytochrom P450-Reduktase wurden von der Firma BD Biosciences (Bedford, MA, USA) bezogen. Das CYP3A4 enthielt zusätzlich Cytochrom-b5. Cytochrom P450-Isoenzym 4F2 inklusive NADH-Cytochrom P450-Reduktase und Cytochrom-b5 wurde zweimal von der Firma tebu-bio GmbH (Offenbach) bezogen und wies eine spezifische Aktivität von 2.7 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹ bzw. 2.9 pmol \times min⁻¹ \times pmol P450⁻¹ auf.

Die porcinen Lebermikrosomen als Cytochrom P450-Enzymquelle wurden von Carmen Krischkowski nach einem im Arbeitskreis Clement standardisierten Verfahren gewonnen.²²⁹

Die Lebern wurden vom örtlichen Schlachthof in Bordesholm geholt und direkt nach Entnahme für den Transport in eisgekühltem 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Na₂-EDTA, pH 7.4 gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei einer Umgebungstemperatur von 0-4 °C. Für die weitere Verarbeitung wurden die Leberlappen mit einem 50 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7.4) perfundiert und gewaschen. Das Organ wurde in Stücke geschnitten und erneut mit gleichem Puffer gewaschen, bis das Waschwasser klar war. Die Fragmente wurden in einem handelsüblichen Fleischwolf weiter zerkleinert und der entstandene Organbrei in den Durchflusshomogenisator gegeben. Das Homogenat wurde durch ein Plastiksieb von Resten grober Stücke befreit. Die Mikrosomen wurden daraus mittels differentieller Ultrafiltration gewonnen.²³⁰ Die erhaltenen Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

7.5.2.2 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Omura *et al.* [1964].²³¹ Es wurde das Differenzspektrum des reduzierten Cytochrom P450 und des reduzierten Cytochrom P450-CO-Komplexes vermessen. Dazu wurden 100 µl Enzymfraktion mit 1.9 ml 100 mM Phosphatpuffer verdünnt und in eine Küvette gegeben. Es wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit hinzugegeben und mit dem Spatel eine Minute gerührt. Das Absorptionsspektrum des reduzierten Cytochrom P450 wurde im Wellenlängenbereich von 400-500 nm aufgenommen. Anschließend wurde unter Entstehung von Blasen für 20 Sekunden CO in die Küvette geleitet und das zweite Spektrum aufgenommen. Durch Subtraktion wurde das Differenzspektrum erhalten, woraus sich mit Hilfe des empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten von 91 mM⁻¹ × cm⁻¹ der Cytochrom P450-Gehalt berechnen ließ. Die verwendete Charge 130110 enthielt einen P450-Gehalt von 261.2 pmol/mg.

7.5.2.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden Benzamidin (**15**) und Benzamidoxim (**14**) je zweimal in 9 Konzentrationen von 0.25-500 µM in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 gelöst und je zweimal per HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) vermessen.

Für die Bestimmung der 20-minütigen Wiederfindung mit Dihydroxybenzamidinen wurden die gleichen Konzentrationen BA **15** und BAO **14** je zweimal in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.0 gelöst und 3 mM des inkubierten Dihydroxybenzamidins (BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e**, BDHAAce **13d**) zugesetzt. Außerdem enthielten die Ansätze 5 % DMSO, 0.1 mg abgekochte Mitochondrien pro 150 µl-Ansatz. Die Proben wurden 5 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde ihnen 1 mM NADH zugesetzt und 20 min inkubiert. Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von 150 µl (1:1) eiskaltem Methanol mit 1 % Ameisensäure abgebrochen. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und zweimal per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.6).

Für die Bestimmung der zweistündigen Wiederfindung wurden BA **15** und BAO **14** je zweimal in 9 Konzentrationen von 0.25-20 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 gelöst. Die Wiederfindungsansätze für die zweistündige Inkubation enthielt 1.5 mM *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**). Außerdem enthielten die Ansätze 0.1 mg abgekochte Mikrosomen pro 150 µl-Ansatz. Die Proben wurden 5 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde ihnen 1 mM NADPH zugesetzt und 120 min inkubiert. Die Wiederfindung wurde

abgebrochen, indem die Proben von 80 µl mit 40 µl eiskaltem Acetonitril versetzt wurden. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und zweimal per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.6).

7.5.2.4 Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Wiederfindungsrate wurde durch Bildung des Quotienten aus den Anstiegen der Wiederfindungs-Regressionsgeraden und der Kalibrierungs-Regressionsgeraden erhalten.

Die Bestimmungsgrenze wurde durch eine maximale relative Standardabweichung von 10 % festgelegt. Für die Nachweisgrenze wurde ermittelt, ab welcher Konzentration ein Peak eindeutig der betreffenden Substanz zuzuordnen war. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis betrug an der Nachweisgrenze mindestens 3:1.

7.5.2.5 Inkubationsbedingungen

Ein typischer Inkubationsansatz für die Einfachbestimmung nach 20 Minuten enthielt 0.1 mg Schweinelebermikrosomen und 3 mM Dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e** bzw. BDHAAce **13d**) in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 mit 5 % DMSO in 150 µl in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß. Jede Inkubation wurde zweimal durchgeführt. Nach 5-minütigem Vorinkubieren bei 37 °C im Schüttelwasserbad wurde 1 mM NADPH zugesetzt und weitere 20 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol/1 % Ameisensäure gestoppt. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und zweimal per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.6).

Für die zweistündigen Inkubationsansätze wurden 0.1 mg Schweinelebermikrosomen (SLMs) und 1.5 mM BDHA2OMe **30e** in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 in 1000 µl in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß verwendet. Für die Inkubationsansätze mit rekombinanten CYP450-Isoenzymen wurde anstelle der SLMs 25 pmol CYP450-Isoenzym unter Zusatz von mindestens 25 pmol Cytochrom-b5 (CYB5) und mindestens 2.5 pmol NADH-Cytochrom-b5-Reduktase (CYB5R) eingesetzt. Die kommerziell bezogenen CYP450-Isoenzyme enthielten teilweise höhere Konzentrationen an CYB5 und CYB5R. Jede Inkubation wurde zweimal durchgeführt. Nach 5-minütigem Vorinkubieren bei 37 °C im Schüttelwasserbad wurde 1 mM NADPH zugesetzt und nach den entsprechenden Zeitpunkten jeweils Proben von 80 µl gezogen, welche mit 40 µl eiskaltem Acetonitril versetzt wurden. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und zweimal per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.6).

7.5.3 Inkubationen mit der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente mARC

7.5.3.1 Enzymquellen

Die rekombinanten Enzyme hmARC1 und hmARC2, Cytochrom b5 und Cytochrom b5-Reduktase wurden vom Arbeitskreis von Prof. Mendel (Molekular- und Zellbiologie, TU Carolo-Wilhelmina Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Die porcinen Lebermitochondrien und die porcine äußere Mitochondrienmembran (OMV) als mARC-Enzymquellen wurden nach einem im Arbeitskreis Clement standardisierten Verfahren gewonnen:

Die Lebern wurden vom örtlichen Schlachthof in Bordesholm geholt und direkt nach Entnahme für den Transport in eisgekühltem 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Na₂-EDTA, pH 7.4 gelagert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 7.5.2.1 beschrieben. Durch fraktionierte Zentrifugation nach einer Modifikation von Hovius [1990]²³² in Anlehnung an die Vorschrift von Clement *et al.* [2005]⁴⁹ wurden die porcinen Mitochondrien isoliert. Aus den Lebermitochondrien wurde nach einem modifizierten Verfahren von de Kroon *et al.* [1997]²³³ die äußere Mitochondrienmembran (OMV) gewonnen.

Für die Inkubationsstudien mit *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (BDHA **9e**), *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (BDHA2OMe **30e**) und 4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol (BDHAAce **13d**) wurde die Mitochondrienfraktion der spezifischen Aktivität 16.92 nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹ (Charge 040509) verwendet. Das rekombinante humane mARC1-Enzym (Charge 020812) besaß einen Molybdängehalt von 12.82 nmol/mg Protein. Der Molybdängehalt von dem rekombinanten humanen mARC2-Enzym (Charge 020812) wurde auf 11.05 nmol/mg Protein bestimmt. Die Inkubationen der *N*-substituierten Amidoxime **74** erfolgte mit der äußeren Mitochondrienmembran (SLOMV) der spezifischen Aktivität von 82.03 nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹ (Charge 210709). Für die Inkubationen mit mARC wurde rhmARC1 (Charge TP 1000 N-del # Pool 2010 C aus 08-09) mit einem Molybdängehalt von 25.96 nmol/mg Protein verwendet und das rhmARC2 (Charge 14.(13.)01.2013) besaß einen Molybdängehalt von 36.3 nmol/mg Protein. Alle Wiederfindungen wurden mit abgekochten Mitochondrien der spezifischen Aktivität von 30.0 nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹ (Charge 240809) durchgeführt.

7.5.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung zur Untersuchung der Dihydroxybenzamidine wurden BA **15**, BAO **14** und BAOMe **72** in 9 Konzentrationen von 0.25-500 µM in Phosphatpuffer pH 6.0 gelöst und per HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) vermessen.

Zur Kalibrierung *N*-substituierter Benzamidine **75** wurden die entsprechenden Derivate (BA **15**, BANMe **75a**, BA2NMe **75c**, BAPh **75b**, BAPip **75d**, BAPhMe **75e**) in 9 Konzentrationen von 0.25-500 µM in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.0 gelöst und per HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) vermessen.

Für die Bestimmung der 20-minütigen Wiederfindung von Benzamidin (**15**), Benzamidoxim (**14**) und *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) mit Dihydroxybenzamidinen wurde wie in Kapitel 7.5.2.3 beschrieben verfahren.

Für die Bestimmung der 20-minütigen Wiederfindung mit *N*-substituierten Benzamidoximen **74** wurden die gleichen Konzentrationen des entsprechenden *N*-substituierten Benzamidins **75** in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.0 gelöst und 3 mM des zugehörigen *N*-substituierten Amidoxims **74** zugesetzt. Außerdem enthielten die Ansätze 5 % DMSO, 0.1 mg abgekochte Mitochondrien pro 150 µl-Ansatz. Die Proben wurden 5 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde ihnen 1 mM NADH zugesetzt und 20 min inkubiert. Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von 150 µl (1:1) eiskaltem Methanol gestoppt. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.7).

7.5.3.3 Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze wurden analog zu Kapitel 7.5.2.4 durchgeführt.

7.5.3.4 Inkubationsbedingungen

Ein typischer Inkubationsansatz für die Einfachbestimmung nach 20 Minuten enthielt 0.1 mg Schweinelebermitochondrien und 3 mM Dihydroxybenzamidin (BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** bzw. BDHAAce **13d**) in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.0 mit 5 % DMSO in 150 µl in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß. Nach 5-minütigem Vorinkubieren bei 37 °C im Schüttelwasserbad wurde 1 mM NADH zugesetzt und weitere 20 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Jede Inkubation wurde zweimal durchgeführt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol/1 % Ameisensäure gestoppt. Nach 5-minütigem Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in Vials pipettiert und zweimal per HPLC vermessen (siehe Kapitel 7.5.6).

Die Inkubation *N*-substituierter Benzamidoxime **74** für 20 Minuten wurde in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 0.005 mg porciner äußerer Mitochondrienmembran und 3 mM *N*-substituiertem Benzamidoxim **74** in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.0 und 5 % DMSO in 150 µl durchgeführt. Es wurde verfahren wie bei den 20-minütigen Inkubationen von Dihydroxybenzamidinen mit Mitochondrien. Zum Inkubationsstart wurde ebenfalls 1 mM NADH zugesetzt. Für die Inkubationen mit rekombinanten humanen mARC-Enzymen wurden 7.0 µg rhmARC1 bzw. rhmARC2, 75 pmol CYB5B und 7.5 pmol CYB5R in einem 150 µl-Inkubationsansatz eingesetzt. Als Puffermedium wurde 20 mM MES, pH 6.0 verwendet. Alle anderen Inkubationsbedingungen entsprachen den Inkubationen mit der OMV. Die HPLC-Methode ist in Kapitel 7.5.7 aufgeführt.

7.5.4 Inkubationen mit Mikrosomen und Mitochondrien

7.5.4.1 Enzymquellen

Es wurden die porcinen Mikrosomen von Carmen Krischkowski (siehe Kapitel 7.5.2.1) und die Schweinelebermitochondrien aus Kapitel 7.5.3.1 verwendet. Die Isolierung aus Schweineleber erfolgte wie in den Kapiteln beschrieben.

7.5.4.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden BA **15** und BAO **14** je zweimal in 9 Konzentrationen von 0.25-500 µM in Acetonitril gelöst und per HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) vermessen.

Für die Bestimmung der 20-minütigen Wiederfindung von BA **15** und BAO **14** neben den Dihydroxybenzamidinen BDHA **9e**, BDHA2OMe **30e** und BDHAAce **13d** wurde wie in Kapitel 7.5.2.3 beschrieben vorgegangen.

Für die Bestimmung der zweistündigen Wiederfindung von BA **15** und BAO **14** neben BDHA2OMe **30e** wurde wie in Kapitel 7.5.2.3 aufgeführt verfahren.

Es wurde die HPLC-Methode aus Kapitel 7.5.6 verwendet.

7.5.4.3 Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze wurden analog zu Kapitel 7.5.2.4 durchgeführt.

7.5.4.4 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationsbedingungen entsprechen denen für die Umsetzung mit porcinen Mikrosomen (siehe Kapitel 7.5.2.5). Es wurden jeweils 0.1 mg porcine Lebermikrosomen und 0.1 mg porcine Lebermitochondrien in einem 150 µl-Ansatz verwendet.

7.5.5 *In vivo*-Untersuchungen der Bioaktivierung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin in Ratten

7.5.5.1 Vorbereitung

Das beantragte Versuchsvorhaben wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig-Holstein genehmigt und nach anerkannten Richtlinien²³⁴ in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck (Prof. Dr. W. Raasch) durchgeführt.

Es wurden 12 männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 380-450 g eingesetzt. Die Ratten wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je sechs Tieren eingeteilt.

Tabelle 7-1: *In vivo* Versuchsprotokoll für die Testung von *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (30e) in Ratten.

Verbindung	Benzamidin (15)	<i>O,O'</i> -Dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin (30e)
Applikationsart	intravenös	oral
Dosierung	5 mg/kg KG	50 mg/kg KG
Formulierung	Lösung von BA-HCl*H ₂ O 15 in 0.9 % NaCl <i>ad us. vet.</i>	Lösung in Speiseöl
Anzahl der Ratten	6	6
Blutentnahmezeitpunkte in min	0	0
	5	15
	10	30
	20	60
	45	120
	90	180
	180	360

Die Ratten wurden bei Raumtemperatur gehalten. Ihnen stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Zwei Wochen vor dem Versuch wurden sie an die Laborbedingungen gewöhnt. Zwei Tage vor der Applikation wurde den Ratten unter Phenobarbital-Betäubung (60 mg/kg KG) ein permanenter Polyethylen-Katheter in die rechte femorale Vene und Arterie eingesetzt. Die Katheter wurden unter die Rückenhaut gelegt und im Bereich der Wirbelsäule nach außen geleitet und an der Haut fixiert. Den Ratten, die für die orale Applikation bestimmt waren, wurde nur ein arterieller Katheter implantiert. Die Katheter wurden mit Heparinlösung (300 µl, 250 I.E.) gespült. Nach der Operation wurden die Versuchstiere bis zur Beendigung der Studie einzeln in geeigneten Käfigen

gehalten. Ein Tag vor dem Versuch wurden die Ratten gefastet, hatten aber Wasser weiterhin *ad libitum* zur Verfügung.

7.5.5.2 Applikation der Proben

Für die orale Applikation wurden 50 mg *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) *ad* 1000 µl in Speiseöl gelöst. Jeder Ratte wurde das Volumen in µl, was dem Gewicht der Ratte in g entspricht, mit Hilfe einer Schlundsonde in den Magen appliziert, was einer Dosierung von 50 mg/kg KG entsprach.

Die intravenösen Applikationen erfolgten über den implantierten Venenkatheter. Dazu wurden 29.1 mg Benzamidinhydrochlorid-Monohydrat **15** in 1000 µl NaCl 0.9 % *ad us. vet.* gelöst, was einer Konzentration von 20 mg/ml Benzamidin (**15**) entsprach. Jeder Ratte wurde der Volumenanteil von 250 µl der Lösung, der dem Gewichtsanteil von 1000 g der Ratte entspricht, injiziert ($V(\text{inj. in } \mu\text{l}) = 250 \mu\text{l} \times [\text{Gewicht der Ratte in g}]/1000 \text{ g}$).

7.5.5.3 Blutentnahme

Vor der Entnahme des Blutes wurde die sich im Katheter befindliche Heparinlösung und wenige µl Blut angesogen und verworfen. Die Blutproben von etwa 300 µl wurden in Kalium-EDTA-Röhrchen (Microvetten) zu bestimmten Zeiten nach Applikation (siehe Tabelle 7-1) über den arteriellen Katheter entnommen. Zur Verhinderung der Verstopfung des Katheters mit geronnenem Blut wurde mit etwa 200 µl einer Lösung aus Heparin und NaCl (50 I.E. Heparin/ml) gespült.

7.5.5.4 Probenaufarbeitung

Unmittelbar nach Entnahme der Blutproben wurden diese mit 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das so als Überstand abgetrennte Plasma wurde in 1.5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

150 µl der Proben wurden nach Auftauen mit 450 µl Acetonitril (1:3) versetzt und 10 Minuten geschüttelt, um Plasmaproteine zu fällen. Die Proben wurden erneut für 60 Minuten bei -80 °C eingefroren und das proteinhaltige Fällungsprodukt bei 10000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der vollständige Überstand wurde in Eppis überführt und das organische Lösungsmittel über eine Stunde ohne Vakuum mit Luft unter schwachem Druck bei Raumtemperatur verflüchtigt. Die verbliebene wässrige Lösung wurde über Nacht gefriergetrocknet, der Rückstand in 100 µl eines Gemisches aus Fließmittel A und Acetonitril (A/B = 1:2) gelöst, zentrifugiert und der Überstand der HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) zugeführt. Jede Probe wurde zweimal HPLC-chromatographisch vermessen.

7.5.5.5 Kalibrierung und Wiederfindung

Für die Kalibrierung wurden je zwei Lösungen aus Benzamidin (**15**), Benzamidoxim (**14**), *O*-Methylbenzamidoxim (**72**) und *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin (**30e**) im HPLC-Fließmittel mit 9 Konzentrationen zwischen 0.05 µM und 100 µM hergestellt und zweifach HPLC-chromatographisch vermessen.

Zur Ermittlung der Wiederfindungen wurden die Testsubstanzen je zweimal mit Konzentrationen zwischen 0.05 µM und 100 µM in Rattenplasma gelöst, wie in Kapitel 7.5.5.4 beschrieben aufgearbeitet und je zweimal mittels HPLC (siehe Kapitel 7.5.6) vermessen.

7.5.5.6 Plasmaproteinbindung

Der verwendete Sörensen-Phosphatpuffer wurde durch Lösen von 30.4 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 8.7 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 99.2 mM Natriumchlorid in einem Liter *Aqua bidest*, Einstellen des pH-Wertes auf pH 7.4, Filtration und Entgasung im Ultraschallbad hergestellt.

Es wurde Plasma aus Ratten-Schlachtblut einer vergangenen Tierstudie sowie humanes Plasma eines männlichen gesunden Spenders verwendet.

Die pipettierten Proben wurden mit VIVASPIN 500 Ultrafiltrationseinheiten (Fa. sartorius stedim biotech, Göttingen) zentrifugiert.

Zur Analyse wurde die HPLC-Methode des Kapitels 7.5.6 verwendet. Die Ansätze wurden je zweimal vermessen.

Die Kalibrierung zur Berechnung der wiedergefundenen Konzentrationen im Sörensen-Phosphatpuffer mit und ohne Ultrafiltration wurden zwischen 0 und 50 μM in Sörensen-Phosphatpuffer pipettiert und entsprachen alle einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 > 0.999$. Die Kalibrierungen in Rattenplasma wurden in Konzentrationen zwischen 0 und 50 μM pipettiert und besaßen einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 > 0.99$.

7.5.6 HPLC-Analytik zur Trennung von Dihydroxybenzamidinen, Benzamidoximen und Benzamidin

Die Analytik erfolgte mit einem Waters HPLC-System mit einer binären Waters 600 Pumpe, Waters 600 E System Controller, Waters 717 plus Autosampler, Waters 2487 Dual λ Absorptionsdetektor, Knauer Entgaser und der EZ Chrom Elite Auswertsoftware.

Säule:	Poroshell 120 EC-C18 (3.0 \times 50 mm, 2.7 μm) (Fa. Agilent, USA) mit Phenomenex C18 Vorsäule (AJ0-8775)
Mobile Phase:	92 % A: 95 % (v/v) 10 mM Na-Octylsulfonat, pH 2.5 + 5 % Acetonitril 8 % B: Acetonitril
Flussrate:	0.4 ml/min
Laufzeit:	33 min
Detektion:	UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 229 \text{ nm}$
Injektionsvolumen:	5 μl
Retentionszeiten:	
BAO 14	11.5 min \pm 0.1 min
BAOMe 72	13.2 min \pm 0.1 min
BA 15	14.4 min \pm 0.2 min
BDHA 9e	17.2 min \pm 0.1 min
BDHA2OMe 30e	19.8 min \pm 0.1 min
BDHAAce 13d	20.0 min \pm 0.2 min

7.5.7 HPLC-Analytik zur Trennung *N*-substituierter Benzamidoxime von *N*-substituierten Benzamidinen

Es wurde ein Waters HPLC-System mit binärer Waters 616 Pumpe, Waters 600S Controller, Waters 717 plus Autosampler, Waters 486 Tunable Absorbance Detector und Postnova analytics PN7505 Vacuum Degasser verwendet.

Säule:	Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 50 mm, 2.7 μm) (Fa. Agilent, USA) mit Phenomenex C18 Vorsäule (AJ0-8775)
Mobile Phase:	A: 95 % (v/v) 10 mM Na-Octylsulfonat, pH 3.0 + 5 % Acetonitril B: Acetonitril
Flussrate:	0.3 ml/min
Detektion:	UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 229$ nm
Injektionsvolumen:	2 μl

7.5.7.1 Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 90 % B: 10 %
Laufzeit:	20 min
Retentionszeiten:	
BAO 14	11.1 ± 0.2 min
BA 15	14.1 ± 0.2 min

7.5.7.2 Trennung von *N*-Methylbenzamidoxim und *N*-Methylbenzamidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 85 % B: 15 %
Laufzeit:	12 min
Retentionszeiten:	
<i>N</i> -Methylbenzamidin (75a)	6.1 ± 0.1 min
<i>N</i> -Methylbenzamidoxim (74a)	8.4 ± 0.2 min

7.5.7.3 Trennung von *N*-Phenylbenzamidoxim und *N*-Phenylbenzamidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 80 % B: 20 %
Laufzeit:	22 min
Retentionszeiten:	
<i>N</i> -Phenylbenzamidin (75b)	7.2 ± 0.1 min
<i>N</i> -Phenylbenzamidoxim (74b)	17.9 ± 0.2 min

7.5.7.4 Trennung von *N,N'*-Dimethylbenzamidoxim und *N,N'*-Dimethylbenzamidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 85 % B: 15 %
Laufzeit:	16 min
Retentionszeiten:	
<i>N,N'</i> -Dimethylbenzamidin (75c)	7.8 ± 0.2 min
<i>N,N'</i> -Dimethylbenzamidoxim (74c)	10.1 ± 0.2 min

7.5.7.5 Trennung von 2-(1-Piperidyl)benzaldoxim und 1-Benzimidoylpiperidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 80 % B: 20 %
Laufzeit:	18 min
Retentionszeiten:	
1-Benzimidoylpiperidin (75d)	10.1 ± 0.2 min
2-(1-Piperidyl)benzaldoxim (74d)	13.3 ± 0.2 min

7.5.7.6 Trennung von *N,N'*-Methylphenylbenzamidoxim und *N,N'*-Methylphenylbenzamidin

Fließmittelzusammensetzung:	A: 75 % B: 25 %
Laufzeit:	21 min
Retentionszeiten:	
<i>N,N'</i> -Methylphenylbenzamidin (75e)	7.0 ± 0.1 min
<i>N,N'</i> -Methylphenylbenzamidoxim (74e)	15.8 ± 0.2 min

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Morris, S. M. Jr.
Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* **2006**, 83, 508S-512S.
2. Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G.
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, 9265-9269.
3. Fukuto, J. M.
Chemistry of *N*-hydroxy-*L*-arginine. *Methods Enzymol* **1996**, 268, 365-375.
4. Clement B., Reeh C.
Improvement of the bioavailability of active substances having an amidine function in medicaments. DE, Europe, Japan, USA, Int. WO 2008009264A1 I. July 10, **2007**.
5. Seel, F.
Atombau und chemische Bindung. 8th ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; **1974**.
6. Masic, L. P.
Arginine mimetic structures in biologically active antagonists and inhibitors. *Curr Med Chem* **2006**, 13, 3627-3648.
7. Strong, S. H.; Halperin, J. L.
Confronting atrial fibrillation in the elderly: stroke risk stratification and emerging antithrombotic therapies. *Geriatrics* **2007**, 62, 22-27.
8. Riggs, J. R.; Kolesnikov, A.; Hendrix, J.; Young, W. B.; Shrader, W. D.; Vijaykumar, D.; Stephens, R.; Liu, L.; Pan, L.; Mordenti, J.; Green, M. J.; Sukbuntherng, J.
Factor VIIa inhibitors: A prodrug strategy to improve oral bioavailability. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, 2224-2228.
9. Peterlin-Masic, L.; Cesar, J.; Zega, A.
Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: The prodrug principle. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, 73-91.
10. Priestley, E. S.
Tissue factor–fVIIa inhibition: update on an unfinished quest for a novel oral antithrombotic. *Drug Discovery Today* **2014**, 19, 1440-1444.
11. Kitamura, S.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Terashita, Z.-I.; Naka, T.
Orally Active GPIIb/IIIa Antagonists. Synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3S)-4-[(2S)-2-(4-Amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl] acetic acid. *Chem Pharm Bull* **2001**, 49, 268-277.
12. Ilaš, J.; Jakopin, Z.; Borštnar, T.; Stegnar, M.; Kikelj, D.
3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine derivatives combining thrombin inhibitory and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonistic activity as a novel class of antithrombotic compounds with dual function. *J Med Chem* **2008**, 51, 5617-5629.
13. Gibson, W.
Resolution of the species problem in african trypanosomes. *Int J Parasitol* **2007**, 37, 829-838.

14. Hyde, J.
Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol* **2005**, 21, 494-498.
15. Bakunova, S. M.; Bakunov, S. A.; Wenzler, T.; Barszcz, T.; Werbovetz, K. A.; Brun, R.; Tidwell, R. R.
Synthesis and antiprotozoal activity of pyridyl analogues of pentamidine. *J Med Chem.* **2009**, 52, 4657-4667.
16. Bakunov, S. A.; Bakunova, S. M.; Wenzler, T.; Ghebru, M.; Werbovetz, K. A.; Brun, R.; Tidwell, R. R.
Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1*H*-1,2,3-triazoles. *J Med Chem* **2010**, 53, 254-272.
17. Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; Koning, H. P.
Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **2003**, 19, 232-239.
18. Werbovetz, K.
Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Invest Drugs (BioMed Cent)* **2006**, 7, 147-157.
19. Szabo, B.; Fritz, T.; Wedzony, K.
Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* **2001**, 134, 295-304.
20. Steinmann, U.; Estler, C. J.; Dann, O.
 α -Adrenoceptor-blocking properties of some trypanocidal diamidines. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **1987**, 290, 207-214.
21. Bielenberg G. W.; Krieglstein J.
The hypotensive effect of aromatic amidines and imidazolines. *Arzneim Forsch* **1984**, 34, 958-967.
22. Macintosh, F. C.; Paton, W. D.
The liberation of histamine by certain organic bases. *J Physiol* **1949**, 109, 190-219.
23. Olesen, J.
The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol Ther* **2008**, 120, 157-171.
24. Ramnauth, J.; Speed, J.; Maddaford, S. P.; Dove, P.; Annedi, S. C.; Renton, P.; Rakhit, S.; Andrews, J.; Silverman, S.; Mladenova, G.; Zinghini, S.; Nair, S.; Catalano, C.; Lee, D. K.; de Felice, M.; Porreca, F.
Design, synthesis, and biological evaluation of 3,4-dihydroquinolin-2(1*H*)-one and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline-based selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitors. *J Med Chem* **2011**, 54, 5562-5575.
25. Annedi, S. C.; Maddaford, S. P.; Ramnauth, J.; Renton, P.; Rybak, T.; Silverman, S.; Rakhit, S.; Mladenova, G.; Dove, P.; Andrews, J. S.; Zhang, D.; Porreca, F.
Discovery of a potent, orally bioavailable and highly selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, *N*-(1-(piperidin-4-yl)indolin-5-yl)thiophene-2-carboximidamide as a pre-clinical development candidate for the treatment of migraine. *Eur J Med Chem* **2012**, 55, 94-107.

26. Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Uhland, K.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Müller, F.; Friedrich, R.; Than, M. E.; Bode, W.; Stürzebecher, J.
Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, 49, 4116-4126.
27. Goswami, R.; Mukherjee, S.; Wohlfahrt, G.; Ghadiyaram, C.; Nagaraj, J.; Chandra, B. R.; Sistla, R. K.; Satyam, L. K.; Samiulla, D. S.; Moilanen, A.; Subramanya, H. S.; Ramachandra, M.
Discovery of pyridyl bis(oxy)dibenzimidamide derivatives as selective matriptase inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **2013**, 4, 1152-1157.
28. Beaulieu, A.; Gravel, E.; Cloutier, A.; Marois, I.; Colombo, E.; Desilets, A.; Verreault, C.; Leduc, R.; Marsault, E.; Richter, M. V.
Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol* **2013**, 87, 4237-4251.
29. Meyer, D.; Sielaff, F.; Hammami, M.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Garten, W.; Steinmetzer, T.
Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochem J* **2013**, 452, 331-343.
30. Hammami, M.; Rühmann, E.; Maurer, E.; Heine, A.; Gütschow, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T.
New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase. *Med Chem Commun* **2012**, 3, 807-813.
31. Verma, A.; Verma, B.; Prajapati, S. K.; Tripathi, K.
Prodrug as a chemical delivery system: a review. *Asian J Res Chem* **2009**, 2, 100-103.
32. Tripathi, K. D.
Essentials of medical pharmacology. 7th ed. New Dehli: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.; **2013**.
33. Sloan, K. B.
Prodrugs. New York: M. Dekker; **1992**.
34. Klebe, G.
Wirkstoffdesign. 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; **2009**.
35. Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B.
Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J Med Chem* **2004**, 47, 2393-2404.
36. Fabian, J.; Schepmann, D.; Wünsch, B.
Prodrugs - Arzneistoffe mit maßgeschneiderten Eigenschaften. *Pharm Ztg online* **2011**.
37. Amidon, G. L.; Lennernaes, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R.
A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **1995**, 12, 413-420.
38. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev* **2001**, 46, 3-26.
39. Leeson, P.
Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature* **2012**, 481, 455-456.

40. Alexander, J.; Cargill, R.; Michelson, S. R.; Schwam, H.
(Acyloxy)alkyl carbamates as novel bioreversible prodrugs for amines: increased permeation through biological membranes. *J Med Chem* **1988**, 31, 318-322.
41. Koshio, H.; Hirayama, F.; Ishihara, T.; Kaizawa, H.; Shigenaga, T.; Taniuchi, Y.; Sato, K.; Moritani, Y.; Iwatsuki, Y.; Uemura, T.; Kaku, S.; Kawasaki, T.; Matsumoto, Y.; Sakamoto, S.; Tsukamoto, S.-I.
Orally active factor Xa inhibitor: synthesis and biological activity of masked amidines as prodrugs of novel 1,4-diazepane derivatives. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 5415-5426.
42. Blech, S.; Ebner, T.; Ludwig-Schwellinger, E.; Stangier, J.; Roth, W.
The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos* **2008**, 36, 386-399.
43. Blommel, M. L.; Blommel, A. L.
Dabigatran etexilate: A novel oral direct thrombin inhibitor. *Am J Health-Syst Pharm* **2011**, 68, 1506-1519.
44. Nakabayashi, T.; Gotoh, Y.; Kamada, N.; Fujioka, M.; Ishihara, T.; Hirabayashi, A.; Sato, H.
Pharmacokinetics of the amidine prodrug of a novel oral anticoagulant factor VIIa inhibitor (AS1924269-00) in rats. *Pharmazie* **2013**, 68, 349-354.
45. Nakabayashi, T.; Gotoh, Y.; Kamada, N.; Fujioka, M.; Ishihara, T.; Hirabayashi, A.; Sato, H.
Characterization of in vitro biotransformation of the new oral anticoagulants, the factor VIIa inhibitors AS1927819-00 and AS1932804-00. *Pharmazie* **2013**, 68, 406-413.
46. Kode, N.; Vanden Eynde, J.; Mayence, A.; Wang, G.; Huang, T.
Design and synthesis of N1,N5-bis[4-(5-Alkyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl]glutaramides as potential antifungal prodrugs. *Molecules* **2013**, 18, 11250-11263.
47. Albert, A.; Goldacre, R.; Phillips, J.
The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc* **1948**, 2240-2249.
48. Clement, B.
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: Amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 565-579.
49. Clement, B.; Mau, S.; Deters, S.; Havemeyer, A.
Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and RO 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)-iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1740-1747.
50. Havemeyer, A.; Grunewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Mendel, R.; Erdelyi, P.; Fischer, J.; Clement, B.
Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecixib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab Dispos* **2010**, 38, 1917-1921.
51. Clement, B.; Lopian, K.
Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 645-651.
52. WILEX AG (Arnold, K.)
MESUPRON® erreicht das primäre Ziel Wirksamkeit in der Proof of Concept Phase II-Brustkrebsstudie. Pressemitteilung München; **2012**.

53. Heinemann, V.; Ebert, M. P.; Laubender, R. P.; Bevan, P.; Mala, C.; Boeck, S.
Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* **2013**, 108, 766-770.
54. Froriep, D.
Reduktion N-oxygenierter Verbindungen durch die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC). Dissertation. Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2013**.
55. Ertongur, S.; Lang, S.; Mack, B.; Wosikowski, K.; Muehlenweg, B.; Gires, O.
Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* **2004**, 110, 815-824.
56. Setyono-Han, B.; Stürzebecher, J.; Schmalix, W. A.; Muehlenweg, B.; Sieuwerts, A. M.; Timmermans, M.; Magdolen, V.; Schmitt, M.; Klijn, J. G.; Foekens, J. A.
Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1. *Thromb Haemost* **2005**, 93, 779-786.
57. Meyer, J. E.; Brocks, C.; Graefe, H.
The oral serine protease inhibitor WX-671 - first experience in patients with advanced head and neck carcinoma. *Breast Care* **2008**, 3, 20-24.
58. Pillay, V.; Dass, C. R.; Choong, P. F.
The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. *Trends Biotechnol* **2007**, 25, 33-39.
59. Heinemann, V.; Ebert, M.; Pinter, T.
Randomized phase II trial with an uPA inhibitor (WX-671) in patients with locally advanced non-metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* **2010**, 21, 226.
60. Patrick, D. A.; Bakunov, S. A.; Bakunova, S. M.; Wenzler, T.; Brun, R.; Tidwell, R. R.
Antiprotozoal activity of dicationic 3,5-diphenylisoxazoles, their prodrugs and aza-analogues. *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, 559-576.
61. Clement, B.; Bürenheide, A.; Rieckert, W.; Schwarz, J.
Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, 1, 1260-1267.
62. Tidwell, R. R.; Jones, S. K.; Geratz, J. D.; Ohemeng, K. A.; Bell, C. A.; Berger, B. J.; Hall, J. E.
Development of pentamidine analogues as new agents for the treatment of pneumocystis carinii pneumonia. *Ann NY Acad Sci* **1990**, 616, 421-441.
63. Zhou, L.; Lee, K.; Thakker, D. R.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E.
Enhanced permeability of the antimicrobial agent 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan across caco-2 cell monolayers via its methylamidoxime prodrug. *Pharm Res* **2002**, 19, 1689-1695.
64. Wang, M. Z.; Saulter, J. Y.; Usuki, E.; Cheung, Y.-L.; Hall, M.; Bridges, A. S.; Loewen, G.; Parkinson, O. T.; Stephens, C. E.; Allen, J. L.; Zeldin, D. C.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Parkinson, A.; Paine, M. F.; Hall, J. E.
CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the O-demethylation of the antiparasitic prodrug DB289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime]. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 1985-1994.

65. Wenzler, T.; Boykin, D. W.; Ismail, M. A.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; Brun, R.
New treatment option for second-stage african sleeping sickness: *In vitro* and *in vivo* efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, 53, 4185-4192.
66. Harrill, A. H; DeSmet, K. D; Wolf, K. K; Bridges, A. S; Eaddy, J. S; Kurtz, C. L; Hall, J. E; Paine, M. F; Tidwell, R. R; Watkins, P. B.
A mouse diversity panel approach reveals the potential for clinical kidney injury due to DB289 not predicted by classical rodent models. *Toxicol Sci* **2012**, 130, 416-426.
67. Deswarte, S.; Pezzoli, A.; Armand, J.
N-hydroxy amidoximes and imides in aqueous media. *C R Seances Acad Sci, Ser C* **1970**, 25, 2062-2065.
68. Eriksson, U. G.; Bredberg, U.; Hoffmann, K.-J.; Thuresson, A.; Gabrielsson, M.; Ericsson, H.; Ahnoff, M.; Gislen, K.; Fager, G.; Gustafsson, D.
Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 294-305.
69. Reeh, C.; Wundt, J.; Clement, B.
N,N'-Dihydroxyamidines: A new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J Med Chem* **2007**, 50, 6730-6734.
70. Hungeling, H.
Neue Prodrugs von Diamidinen zur Therapie protozoischer Erkrankungen. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2009**.
71. Ley, H.
Ueber Oxyamidoxime, eine neue Klasse von Hydroxylaminderivaten. I. *Ber Dtsch Chem Ges* **1898**, T2, 2126-2129.
72. Armand, J.; Minvielle, R. M.
Formic and benzoic hydroxyamidoximes and their nitrosolic acids. *Compt Rend* **1965**, 260, 2512-2515.
73. Wieland, H.; Bauer, H.
Benzenylnitrosolic acid. *Ber Dtsch Chem Ges* **1906**, 39, 1480-1488.
74. Valentini, F.; Gouzerh, P.
Coordination of nickel(III) and iron(II) with the hydroxybenzamidoxime-benzonitrosolic acid redox system. *Compt Rend Acad Sci II C* **1972**, 275, 123-126.
75. Barassin, J.; Armand, J.; Lumbroso, H.
Electric moments and molecular conformation. VII. Benzamidoxime, benzhydroxamoyl chloride, benzhydroxamic and phenylglyoxyhydroxamic acids, and benzhydroxyamidoxime. *Bull Soc Chim Fr* **1969**, 10, 3409-3418.
76. Ley, H.; Ulrich, M.
Inner complex salts. XI. Salt formation in hydroxyamidoximes. *Ber Dtsch Chem Ges* **1914**, 47, 2938-2944.
77. Van't Riet B., Wampler G. L., Elford H. L.
Polyhydroxybenzoic acid derivatives. WO 8404676 A1 **1984**.

78. Kotthaus, J.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Schwering, U.; Hungeling, H.; Müller-Fielitz, H.; Raasch, W.; Clement, B.
New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine. *ChemMedChem* **2011**, 6, 2233-2242.
79. Morrocchi, S.; Ricca, A.
Catalytic action of boron trifluoride in the cycloaddition of benzonitrile oxide with the oxime. *Chim Ind (Milan, Italy)* **1967**, 49, 629-630.
80. Aurich, H. G.; Stork, K.
Aminyl oxides(nitroxides). XX. Formation of aminyl oxides in the reaction of nitrile oxides with hydroxylamines. *Chem Ber* **1975**, 108, 2764-2780.
81. Kelly, D. R.; Baker, S. C.; King, D. S.; de Silva, D. S.; Lord, G.; Taylor, J. P.
Studies of nitrile oxide cycloadditions, and the phenolic oxidative coupling of vanillin aldoxime by *Geobacillus* sp. DDS012 from Italian rye grass silage. *Org Biomol Chem* **2008**, 6, 787-796.
82. Desherces, S.; Barrans, J.; Roubaty, J. L.
Synthesis of 4-hydroxy- Δ^2 -1,2,4-oxadiazolines. *Rev Roum Chim* **1978**, 23, 203-208.
83. Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B.
Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **2006**, 281, 34796-34802.
84. Havemeyer, A.; Lang, J.; Clement, B.
The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab Rev* **2011**, 43, 524-539.
85. Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R.; Clement, B.
The fourth molybdenum containing enzyme mARC: Cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem* **2008**, 51, 8173-8177.
86. Froriep, D.; Clement, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Reichmann, D.; Schmalix, W.; Havemeyer, A.
Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica* **2013**, 43, 780-784.
87. Jakobs, H. H.; Froriep, D.; Havemeyer, A.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B.
The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): Involvement in metabolic reduction of *N*-oxides, oximes and *N*-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* **2014**, 9, 2381-2387.
88. Krompholz, N.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R.-R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A.
The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of *N*-hydroxylated base analogues. *Chem Res Toxicol* **2012**, 25, 2443-2450.
89. Neve, E. P. A.; Nordling, A.; Andersson, T. B.; Hellman, U.; Diczfalussy, U.; Johansson, I.; Ingelman-Sundberg, M.
Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2i of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J Biol Chem* **2012**, 287, 6307-6317.
90. Kotthaus, J.; Wahl, B.; Havemeyer, A.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R.; Bittner, F.; Clement, B.
Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem J* **2011**, 433, 383-391.

91. Reeh, C.
Neue Prodrug-Prinzipien für Amidine. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2008**.
92. Havemeyer, A.
Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des Molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2006**.
93. Grünewald, S.
Studien zur Biotransformation N-hydroxylierter Verbindungen durch molybdäncofaktorabhängige Enzymsysteme. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2008**.
94. Brady, O. L.; Dunn, F. P.
Isomerism of the oximes. III. Hydroxybenzaldoximes. *J Chem Soc, Trans* **1914**, 105, 821-830.
95. Castellano, S.; Kuck, D.; Viviano, M.; Yoo, J.; López-Vallejo, F.; Conti, P.; Tamborini, L.; Pinto, A.; Medina-Franco, J. L.; Sbardella, G.
Synthesis and biochemical evaluation of Δ^2 -isoxazoline derivatives as DNA methyltransferase 1 inhibitors. *J Med Chem* **2011**, 54, 7663-7677.
96. Gawinecki, R.; Andrzejak, S.; Puchala, A.
Efficiency of the Vilsmeier-Haack method in the synthesis of *p*-aminobenzaldehydes. *Org Prep Proced Int* **1998**, 30, 455-460.
97. Zhang, G.; Wen, X.; Wang, Y.; Mo, W.; Ding, C.
Sodium nitrite catalyzed aerobic oxidative deoximation under mild conditions. *J Org Chem* **2011**, 76, 4665-4668.
98. Liu, K.-C.; Shelton, B. R.; Howe, R. K.
A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors). *J Org Chem* **1980**, 45, 3916-3918.
99. Vo, Q. V.; Trenerry, C.; Rochfort, S.; Wadeson, J.; Leyton, C.; Hughes, A. B.
Synthesis and anti-inflammatory activity of aromatic glucosinolates. *Bioorg Med Chem* **2013**, 21, 5945-5954.
100. Müller, P.; Müller-Dolezal, H.; Stoltz, R.; Söll, H.
Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. V/3, 4th Edition. 4th ed. Stuttgart: Thieme-Verlag; **1962**.
101. Kumar, V.; Kaushik, M.
A novel one-pot synthesis of hydroximinoyl chlorides and 2-isoxazolines using *N*-tert-butyl-*N*-chlorocyanamide. *Tetrahedron Lett* **2006**, 47, 1457-1460.
102. Kumar, V.; Kaushik, M.
Tert-butyl-*N*-chlorocyanamide: A novel and versatile reagent in organic synthesis. *Synlett* **2007**, 19, 2937-2951.
103. Jain, N.; Kumar, A.; Chauhan, Shive M. S.
Metalloporphyrin and heteropoly acid catalyzed oxidation of CNOH bonds in an ionic liquid: biomimetic models of nitric oxide synthase. *Tetrahedron Lett* **2005**, 46, 2599-2602.
104. Ernest, I.
Bindung, Struktur und Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie. Wien, New York: Springer-Verlag; **1972**.

105. Ismail, T.; Shafi, S.; Singh, P. P.; Qazi, N. A.; Sawant, S. D.; Ali, I.; Khan, I. A.; Kumar, H. M. S.; Qazi, G. N.; Alam, M. S.
Biologically active hydroxymoyl chlorides as antifungal agents. *Indian J Chem, Sect B: Org Chem Incl Med Chem* **2008**, 47B, 740-747.
106. Popławska, M.; Żukowska, G.; Cudziło, S.; Bystrzejewski, M.
Chemical functionalization of carbon-encapsulated magnetic nanoparticles by 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxide. *Carbon* **2010**, 48, 1318-1320.
107. Jiao, J.; Zhang, X.-R.; Chang, N.-H.; Wang, J.; Wei, J.-F.; Shi, X.-Y.; Chen, Z.-G.
A facile and practical copper powder-catalyzed, organic solvent- and ligand-free Ullmann amination of aryl halides. *J Org Chem* **2011**, 76, 1180-1183.
108. Cai, S.; Yang, K.; Wang, D. Z.
Gold catalysis coupled with visible light stimulation: Syntheses of functionalized indoles. *Org Lett* **2014**, 16, 2606-2609.
109. Yudin, L. G.; Blokhin, A. V.; Terenin, V. I.; Bundel', Y. G.
Activating action of an immonium group in replacement of alkoxyl and halo atom by alkylamino group in the benzene ring. *Zh Org Khim* **1983**, 19, 2361-2366, 2064-2068.
110. Bellamy, F.; Ou, K.
Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett* **1984**, 25, 839-842.
111. Becker, H. G. O.
Organikum. 21st ed. Weinheim: Wiley-VCH; **2001**.
112. Johnstone, R. A. W.; Wilby, A. H.; Entwistle, I. D.
Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation and its relation to other methods for reduction of organic compounds. *Chem Rev* **1985**, 85, 129-170.
113. Corey, E. J.; Niwa, H.; Knolle, J.
Total synthesis of (S)-12-hydroxy-5,8,14-*cis*,-10-*trans*-eicosatetraenoic acid. *J Am Chem Soc* **1978**, 100, 1942-1943.
114. Kim, S.; Park, J. H.
Selective removal of tetrahydropyranyl ethers in the presence of *tert*-butyldimethylsilyl ethers with magnesium bromide in ether. *Tetrahedron Lett* **1987**, 28, 439-440.
115. Zhang, W.; Robins, M. J.
Removal of silyl protecting groups from hydroxyl functions with ammonium fluoride in methanol. *Tetrahedron Lett* **1992**, 33, 1177-1180.
116. Schwarz, L.; Girreser, U.; Clement, B.
Synthesis of *p*-amino-*N,N'*-dihydroxybenzamidine using a TBDMS protecting group protocol. *Tetrahedron Lett* **2014**, 55, 3322-3324.
117. Nič, M.; Jirát, J.; Košata, B.; Jenkins, A.; McNaught, A.
IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC; **2009**.
118. Hädener, A.; Kaufmann, H.
Grundlagen der organischen Chemie. 11., überarb. und erw. Aufl. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser; **2006**.
119. Marvin 14.7.7, **2014**, ChemAxon <http://www.chemaxon.com>.

120. Smith, M.; March, J.
March's advanced organic chemistry. 6th ed. Hoboken, New York: Wiley-Interscience; **2007**.
121. Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.
Wirkstoffdesign, Spektrum Lehrbuch. Unveränd. Nachdr. d. 1. Aufl. 1996. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; **2002**.
122. Sangster, J.
Octanol-water partition coefficients. Chichester, New York: Wiley; **1997**.
123. Krass, J. D.; Jastorff, B.; Genieser, H.-G.
Determination of lipophilicity by gradient elution high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **1997**, 69, 2575-2581.
124. Le Drian, C.; Greene, A. E.
Efficient, stereocontrolled total syntheses of racemic and natural brefeldin-A. *J Am Chem Soc* **1982**, 104, 5473-5483.
125. Horita, K.; Yoshioka, T.; Tanaka, T.; Oikawa, Y.; Yonemitsu, O.
On the selectivity of deprotection of benzyl, mpbm (4-methoxybenzyl) and dmpbm (3,4-dimethoxybenzyl) protecting groups for hydroxy functions. *Tetrahedron* **1986**, 42, 3021-3028.
126. Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Yonemitsu, O.
Highly stereoselective synthesis of methynolide, the aglycone of the 12-membered ring macrolide methymycin, from D-glucose. *Tetrahedron Lett* **1986**, 27, 3647-3650.
127. Williamson, A.
Theory of ether formation. *Justus Liebigs Ann Chem* **1851**, 77, 37-49.
128. Parham, W. E.; Anderson, E. L.
Protection of hydroxy groups. *J Am Chem Soc* **1948**, 70, 4187-4189.
129. Corey, E. J.; Venkateswarlu, A.
Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J Am Chem Soc* **1972**, 94, 6190-6191.
130. Hanessian, S.; Lavalley, P.
The preparation and synthetic utility of *tert*-butyldiphenylsilyl ethers. *Can J Chem* **1975**, 53, 2975-2977.
131. Haslanger, M. F.; Karanewsky, D. S.
Hydroxamates. US 4604407 **1985**.
132. Kocienski, P. J.
Protecting groups. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; **2005**.
133. Stewart, A. O.; Martin, J. G.
Synthesis of (1-aryl-1-alkylethyl)alkoxyamines. *J Org Chem* **1989**, 54, 1221-1223.

134. Shaterian, H. R.; Doostmohammadi, R.; Ghashang, M.; Rahmani, M.
A mild, simple, efficient, and selective protection of hydroxyl groups using silica-supported sodium hydrogen sulfate as a heterogeneous catalyst. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2008**, 183, 3127-3135.
135. Fuhrmann, G. F.
Toxikologie für Naturwissenschaftler. 1st ed. Wiesbaden: Teubner, Studienbücher Chemie; **2006**.
136. Cho, C. H.; Karbasi, R.; Kim, S. H.
Preparation of oxime ester compound as photoinitiator. KR 2009051858 **2009**.
137. Gao, H.; Zhang, J.
A dramatic substituent effect in silver(I)-catalyzed regioselective cyclization of *ortho*-alkynylaryl aldehyde oxime derivatives. *Adv Synth Catal* **2009**, 351, 85-88.
138. Eloy, F.; Lenaers, R.
Chemistry of amidoximes and related compounds. *Chem Rev* **1962**, 62, 155-183.
139. Geffken, D.
Direct *O*-acylation of hydroxylamine and *N*-monosubstituted hydroxylamines by 1-benzoylimidazole. *Chem Ber* **1986**, 119, 744-746.
140. Jencks, W. P.
Reaction of hydroxylamine with activated acyl groups. I. Formation of *O*-acylhydroxylamine. *J Am Chem Soc* **1958**, 80, 4581-4584.
141. Huggett, A. C.; Cone, J. L.; Thorgeirsson, S. S.; Roller, P. P.
Novel synthesis and spectral characterization of an *N*-acetoxyarylamine: *N*-acetoxy-2,4-dinitrophenylamine. *J Org Chem* **1987**, 52, 4933-4937.
142. Lee, S. Y.; Murphy, J. M.; Ukai, A.; Fu, G. C.
Nonenzymatic dynamic kinetic resolution of secondary alcohols via enantioselective acylation: Synthetic and mechanistic studies. *J Am Chem Soc* **2012**, 134, 15149-15153.
143. Geffken, D.
O-Alkanoylhydroxylamine aus Carbonsäuren, 1,1'-Carbonyldiimidazol und Hydroxylammoniumchloriden. *Chem-Ztg* **1986**, 110, 377-379.
144. Polaina, J.; MacCabe, A. P.
Industrial enzymes. Dordrecht: Springer; **2007**.
145. Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S.
Regioselective enzymic preparation of hemisuccinates of polyhydroxylated steroids. *Biocatalysis* **1991**, 5, 131-136.
146. OECD
Guidelines for Testing of Chemicals; Paris, **1993**.
147. Aitken, R. A.; Raut, S. V.
Base-induced cycloreversion of nitrile oxide cycloadducts: conversion of imines into secondary and tertiary amides and aromatic aldehydes into acids without a conventional oxidizing agent. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1996**, 7, 747-751.

148. Barili, P. L.; Berti, G.; Catelani, G.; Colonna, F.; Marra, A.
New results in the isopropylidenation of galactopyranosides. Useful intermediates for the synthesis of galactose derivatives. *Tetrahedron Lett* **1986**, 27, 2307-2310.
149. He, D. Y.; Li, Z. J.; Li, Z. J.; Liu, Y. Q.; Qiu, D. X.; Cai, M. S. Studies on Carbohydrates X. A New Method for the Preparation of Isopropylidene Saccharides. *Synthetic Communications* **1992**, 22, 2653-2658.
150. Gantt, R. W.; Peltier-Pain, P.; Cournoyer, W. J.; Thorson, J. S.
Using simple donors to drive the equilibria of glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Nat Chem Biol* **2011**, 7, 685-691.
151. Johnson, J. E.; Cornell, S. C.
Mechanism of solvolysis reactions of *O*-methylbenzohydroximoyl halides. Stereoelectronic control in formation of and nucleophilic addition to nitrilium ions. *J Org Chem* **1980**, 45, 4144-4148.
152. Lessel, J.
 Δ^2 -1,2,4-Oxadiazoline durch Kondensation von Amidoximen mit Ketonen und Aldehyden. *Arch Pharm, Pharm Med Chem* **1993**, 326, 383-389.
153. Thipyapong, K.; Uehara, T.; Tooyama, Y.; Braband, H.; Alberto, R.; Arano, Y.
Insight into technetium amidoxime complex: Oxo technetium(V) complex of *N*-substituted benzamidoxime as new basics for molecular imaging. *Inorg Chem* **2011**, 50, 992-998.
154. Sielecki-Dzurdz, T. M.
Diaryl *N*-hydroxybenzamidines as antiviral compounds, preparation, compositions, and methods of use thereof. WO 2010077734 **2010**.
155. Gozlan, H.; Michelot, R.; Riche, C.; Rips, R.
Amide oximes: determination of configurations and a study of the mechanism of *Z-E* isomerization. *Tetrahedron* **1977**, 33, 2535-2542.
156. Quadrelli, P.; Invernizzi, A. G.; Falzoni, M.; Caramella, P.
Cycloadditions of nitrile oxides to amidoximes. A general synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazole-4-oxides. *Tetrahedron* **1997**, 53, 1787-1796.
157. Plapinger, R. E.; Owens, O. O.
The reaction of phosphorous-containing enzyme inhibitors with some hydroxylamine derivatives. *J Org Chem* **1956**, 21, 1186-1187.
158. Schwarz, L.; Girreser, U.; Clement, B.
Synthesis and characterization of *para*-substituted *N,N'*-dihydroxybenzamidines and their derivatives as model compounds for a class of prodrugs. *Eur J Org Chem* **2014**, 9, 1961-1975.
159. Fu, H. Y.; Doucet, H.
Methyl 2-furoate: An alternative reagent to furan for palladium-catalysed direct. *Eur J Org Chem* **2011**, 35, 7163-7173.
160. Riebling, L.
Synthese, in vitro Charakterisierung und in vivo Testung neuer Amidin-Prodrugs. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2014**.
161. Raap, J.; Nieuwenhuis, S.; Creemers, A.; Hexspoor, S.; Kragl, U.; Lugtenburg, J.
Synthesis of isotopically labelled L-phenylalanine and L-tyrosine. *Eur J Org Chem* **1999**, 10, 2609-2621.

162. de Nino, A.; Di Donna, L.; Maiuolo, L.; Mazzotti, F.; Sindona, G.
Synthesis of deuterium-labeled azo dyes of the sudan family. *Synthesis* **2008**, 2008, 459-463.
163. Khazaei, A.; Kazem-Rostami, M.; Moosavi-Zare, A.; Bayat, M.; Saednia, S.
Novel one-pot synthesis of thiophenols from related triazenes under mild conditions. *Synlett* **2012**, 23, 1893-1896.
164. Štefane, B.; Kočevár, M.; Polanc, S.
Nitrosation with sodium hexanitrocobaltate(III). *J Org Chem* **1997**, 62, 7165-7169.
165. Smith, W. B.; Ho, O. C.
Application of the isoamyl nitrite-diiodomethane route to aryl iodides. *J Org Chem* **1990**, 55, 2543-2545.
166. Clement, B.
Biotransformation stark basischer funktioneller Gruppen durch Stickstoffoxidation. Habilitationsschrift Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br; **1986**.
167. Xu, S.-Q.; Li, J.-M.
Benzamide oxime. *Acta Crystallogr, Sect E: Struct Rep Online* **2008**, 64, o1469.
168. Girreser, U.; König, M.; Clement, B.
Characterization of *para*-substituted benzamidoximes and benzamidine salts by ¹⁵N NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* **2002**, 40, 202-206.
169. Corsaro, A.
1,3-Dipolar cycloadditions of acridine with nitrile oxides. *Arkivoc* **2002**, 8, 5-15.
170. Cohen, A. D.; Zeng, B.-B.; King, S. B.; Toscano, J. P.
Direct observation of an acyl nitroso species in solution by time-resolved IR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 1444-1445.
171. Chapman, N. B.; Shorter, J.
Correlation analysis in chemistry: recent advances. New York: Plenum Press; **1978**.
172. Brownlee, R. T. C.; Sadek, M.
Natural abundance ¹⁵N chemical shifts in substituted benzamides and thiobenzamides. *Magn Reson Chem* **1986**, 24, 821-826.
173. Pregosin, P. S.; Randall, E. W.; White, A. I.
Nitrogen-15 chemical shifts in ring-substituted benzamides and benzonitriles. *J Chem Soc, Perkin Trans 2 (1972-1999)* **1972**, 5, 513-514.
174. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 09/**2013**. Spectral Database for Organic Compounds SDBS. Available at: SDBSWeb : <http://sdb.sriodb.aist.go.jp>
175. Shorter, J.
Die Hammett-Gleichung - und was daraus in fünfzig Jahren wurde. *Chem Unserer Zeit* **1985**, 19, 197-208.
176. Hasler, J. A.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, C.; Falck, J. R.; Farrell, G.; Kaminsky, L. S.; Spivack, S. D.; Boitier, E.; Beaune, P.
Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* **1999**, 20, 1-137.

177. Guengerich, F. P.
Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* **1991**, 266, 10019-10022.
178. Coon, M. J.; Vaz, Alfin D. N.; Bestervelt, L. L.
Peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB J* **1996**, 10, 428-434.
179. Evans, W. E.
Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **1999**, 286, 487-491.
180. Hille, R.; Nishino, T.; Bittner, F.
Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev* **2011**, 255, 1179-1205.
181. Wahl, B.; Reichmann, D.; Niks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; Mendel, R. R.; Bittner, F.
Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J Biol Chem* **2010**, 285, 37847-37859.
182. Plitzko, B.; Ott, G.; Reichmann, D.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Mendel, R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A.
The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in *N*-reductive metabolism in human cells. *J Biol Chem* **2013**, 288, 20228-20237.
183. Teslovich, T. M.; Musunuru, K.; Smith, A. V.; Edmondson, A. C.; Stylianou, I. M.; Koseki, M.; Pirruccello, J. P.; Ripatti, S.; Chasman, D. I.; Willer, C. J.; Johansen, C. T.; Fouchier, S. W.; Isaacs, A.; Peloso, G. M.; Barbalic, M.; Ricketts, S. L. *et al.*
Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **2010**, 466, (7307), 707-713.
184. Mikula M.; Rubel T.; Karczmarski, J.; Goryca, K.; Dadlez, M.; Ostrowski, J.
Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct Integr Genomics* **2010**, 11, 215-225.
185. Malik, A. N.; Rossios, C.; Al-Kafaji, G.; Shah, A.; Page, R. A.
Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Comm* **2007**, 357, 237-244.
186. Ortiz de Montellano, P. R.
Cytochrome P450. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; **2010**.
187. Mimura, M.; Baba, T.; Yamazaki, H.; Ohmori, S.; Inui, Y.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P.; Shimada, T.
Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **1993**, 21, 1048-1056.
188. Hukkanen, J.; Pelkonen, O.; Hakkola, J.; Raunio, H.
Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* **2002**, 32, 391-411.
189. Hanna, I. H.; Reed, J. R.; Guengerich, F.; Hollenberg, P. F.
Expression of human cytochrome P450 2B6 in *Escherichia coli*: Characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Arch Biochem Biophys* **2000**, 376, 206-216.

190. Yanagihara, Y.; Kariya, S.; Ohtani, M.; Uchino, K.; Aoyama, T.; Yamamura, Y.; Iga, T. Involvement of CYP2B6 in *N*-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **2001**, 29, 887-890.
191. Kent, U. M.
Effect of 17-*alpha*-ethynylestradiol on activities of cytochrome P450 2B (P450 2B) enzymes: Characterization of P450s 2B1 and 2B6 and identification of metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, 300, 549-558.
192. Shimada, T.; Misono, K. S.; Guengerich, F. P.
Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction. *J Biol Chem* **1986**, 261, 909-921.
193. Sandberg, M.; Yasar, Ü.; Strömberg, P.; Höög, J.-O.; Eliasson, E.
Oxidation of celecoxib by polymorphic cytochrome P450 2C9 and alcohol dehydrogenase. *Br J Clin Pharmacol* **2002**, 54, 423-429.
194. Steward, D. J.; Haining, R. L.; Henne, K. R.; Davis, G.; Rushmore, T. H.; Trager, W. F.; Rettie, A. E.
Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* **1997**, 7, 361-367.
195. Kappas, A.; Alvares, A. P.; Anderson, K. E.; Pantuck, E. J.; Pantuck, C. B.; Chang, R.; Conney, A. H.
Effect of charcoal-broiled beef on antipyrine and theophylline metabolism. *Clin Pharmacol Ther (St Louis, MO, U S)* **1978**, 23, 445-450.
196. Puccinelli, E.; Giovanni Gervasi, P.; Longo, V.
Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in pig, a promising animal model. *ACS Chem Neurosci* **2011**, 12, 507-525.
197. Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P.
Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, 270, 414-423.
198. Yue, Q. Y.; Sawe, J.
Different effects of inhibitors on the *O*- and *N*-demethylation of codeine in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* **1997**, 52, 41-47.
199. Subrahmanyam, V.; Renwick, A. B.; Walters, D. G.; Young, P. J.; Price, R. J.; Tonelli, A. P.; Lake, B. G.
Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for *cis*-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **2001**, 29, 1146-1155.
200. Stearns, R. A.; Chakravarty, P. K.; Chen, R.; Chiu, S.-H. L.
Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* **1995**, 23, 207-215.
201. Ju, W.; Yang, S.; Ansede, J. H.; Stephens, C. E.; Bridges, A. S.; Voyksner, R. D.; Ismail, M. A.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E.; Wang, M. Z.
CYP1A1 and CYP1B1-mediated biotransformation of the antitrypanosomal methamidoxime Prodrug DB844 forms novel metabolites through intramolecular rearrangement. *J Pharm Sci* **2014**, 103, 337-349.

202. Beubler, E.
Kompendium der Pharmakologie: Gebräuchliche Arzneimittel in der Praxis. Wien: Springer; **2011**.
203. Testa, B.
Pharmacokinetic optimization in drug research. Zürich, Weinheim, New York: Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH; **2001**.
204. Kriegelstein, J.
Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln. *Klin Wochenschr* **1969**, 47, 1125-1130.
205. Otagiri, M.
A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet*. **2005**, 20, 309-323.
206. Meyer, M. C.; Guttman, D. E.
Novel method for studying protein binding. *J Pharm Sci* **1968**, 57, 1627-1629.
207. Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M.
Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* **2002**, 25, 695-704.
208. Bauch, E.
Dissertation in Vorbereitung. Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2014**.
209. Dunnett, C. W.
A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* **1955**, 50, 1096-1121.
210. ACD/Labs
Advanced Chemistry Development, Software: ACD/Labs; 1994-2014.
211. Newman, M. S.
Steric Effects in Organic Chemistry. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc; **1963**.
212. Steudel, R.; Schenk, P. W.
Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie. 3rd ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; **1975**.
213. Kanth, S. R.; Reddy, G. V.; Rao, V. V. V. N. S. R.; Maitraie, D.; Narsaiah, B.; Rao, P. S.
A simple and convenient method for the reduction of nitroarenes. *Synth Comm* **2002**, 32, 2849-2853.
214. Lu, C.; Guo, Y.; Li, J.; Yao, M.; Liao, Q.; Xie, Z.; Li, X.
Design, synthesis, and evaluation of resveratrol derivatives as A β 1–42 aggregation inhibitors, antioxidants, and neuroprotective agents. *Bioorg Med Chem Letts* **2012**, 22, 7683-7687.
215. Gerritz, S.; Shi, S.; Zhu, S.
Aminoacetamide acyl guanidines as β -secretase inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions, and use in the treatment of neurological disorders. US 20060287287 **2006**.

216. Langa, F.; de La Cruz, P.; Espíldora, E.; González-Cortés, A.; de La Hoz, A.; López-Arza, V. Synthesis and properties of isoxazolo[60]fullerene–donor dyads. *J Org Chem* **2000**, 65, 8675-8684.
217. Gawinecki, R.; Kolehmainen, E.; Kauppinen, R. ^1H and ^{13}C NMR studies of *para*-substituted benzaldoximes for evaluation of the electron donor properties of substituted amino groups. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* **1998**, 25-30.
218. Witek, S.; Bielawski, J.; Bielawska, A. New pesticides and intermediates. Part VII. Some azaalkenyl derivatives of *N*-phenylurea and *N*-phenylcarbamic acid. *Pol J Chem* **1981**, 55.
219. Charrier, J.; Maccormick, S.; Storck, P. *et al.* Aminopyrazine compounds useful as inhibitors of TRA kinase. WO2012US32438 20120405, **2012**.
220. Mokhtari, J.; Naimi-Jamal, M. R.; Hamzeali, H.; Dekamin, M. G.; Kaupp, G. Kneading ball-milling and stoichiometric melts for the quantitative derivatization of carbonyl compounds with gas-solid recovery. *ChemSusChem* **2009**, 2, 248-254.
221. Tavares, A.; Schneider, P. H.; Merlo, A. A. 3,5-Disubstituted isoxazolines as potential molecular kits for liquid-crystalline materials. *Eur J Org Chem* **2009**, 6, 889-897.
222. Zhang, L.-H.; Chung, J. C.; Costello, T. D.; Valvis, I.; Ma, P.; Kauffman, S.; Ward, R. The enantiospecific synthesis of an isoxazoline. A RGD mimic platelet GPIIb/IIIa antagonist. *J Org Chem* **1997**, 62, 2466-2470.
- Catalytic asymmetric allylic and homoallylic diamination of terminal olefins via formal C–H activation. *J Am Chem Soc* **2008**, 130, 8590-8591.
224. Tóth, M.; Kun, S.; Bokor, É.; Benltifa, M.; Tallec, G.; Vidal, S.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L.; Praly, J.-P. Synthesis and structure–activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase. *BioorgMed Chem* **2009**, 17, 4773-4785.
225. Vieira, A. A.; Bryk, F. R.; Conte, G.; Bortoluzzi, A. J.; Gallardo, H. 1,3-Dipolar cycloaddition reaction applied to synthesis of new unsymmetric liquid crystal compounds-based isoxazole. *Tetrahedron Lett* **2009**, 50, 905-908.
226. Hussein, A. Q.; El-Abadelah, M. M.; Sabri, W. S. Heterocycles from nitrile oxides. I. 5-imino- Δ^2 -1,4,2-oxathiazolines. *J Heterocycl Chem* **1983**, 20, 301-304.
227. Bottaro, J. C.; Bedford, C. D.; Dodge, A. Expedient synthesis of mono-trimethylsilylhydroxylamine and bis(trimethylsilyl)hydroxylamine. *Synth Comm* **1985**, 15, 1333-1335.
228. Gaber, A. E.-A. M.; McNab, H. Flash vacuum pyrolysis of *N*-phenylbenzamide oxime and related compounds. *J Anal Appl Pyrolysis* **2009**, 86, 369-374.

229. Krischkowski, C.
mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen und humanen Geweben und Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC. Dissertation Kiel: Christian-Albrechts-Universität; **2014**.
230. Clement, B.; Demesmaeker, M.; Linne, S.
Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: Characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz 1. *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, 682-688.
231. Omura, T.; Sato, R.
Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **1964**, 239, 2370-2378.
232. Hovius, R.; Lambrechts, H.; Nicolay, K.; de Kruijff, B.
Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1990**, 1021, 217-226.
233. de Kroon, A. I.; Dolis, D.; Mayer, A.; Lill, R.; de Kruijff, B.
Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1997**, 1325, 108-116.
234. National Research Council (US) Committee
Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C: National Academies Press; **2011**.

9 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

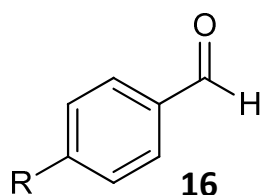
Ac	Acetyl-
ACN	Acetonitril
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i>
ber.	berechnet
Bn	Benzyl-
br	breites Signal (NMR-Spektroskopie)
BSP	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin, 4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-[<i>N</i> -(3-carboxypropinyloxy)]benzamidine
CBCA	<i>N-tert</i> -Butyl- <i>N</i> -chlorcyanamid (24)
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CYP450	Cytochrom P450
d	Dublett (NMR-Spektroskopie)
dd	Dublett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie)
δ	chemische Verschiebung in ppm
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,2-Dimethoxypropan
DMSO- <i>d</i> ₆	vollständig deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
EDGF	<i>Endothelium-derived relaxing Factor</i>
Eppi	Eppendorfgefäß
ESI	Elektrosprayionisierung
Et	Ethyl-
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Essigsäureethylester, Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
Gef.	gefunden

h	hour(s)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hz
<i>K_m</i>	Michaeliskonstante, Konzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
KOAc	Kaliumacetat
konz.	konzentriert
LC/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
log <i>D</i>	dekadischer Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ionisierbarer Moleküle (<i>D</i> -Wert)
log <i>P</i>	dekadischer Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten
m	Multiplett (NMR-Spektroskopie)
M	molar (mol/l)
mARC	<i>Mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i>
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
NADH	β-Nikotinamidadenindinucleotid
NADPH	β-Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid (26)
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
OMV	<i>outer membrane vesicles</i> , äußere Mitochondrienmembran
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
Pd(OAc) ₂	Palladium(II)acetat
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphan)palladium

pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
Ph	Phenyl-
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett (NMR-Spektroskopie)
rf	<i>reflux</i> , Rückfluss
R _f	<i>ratio of front</i> , Retentionsfaktor (DC)
RP	<i>Reversed Phase</i> , Umkehrphase
rpm	<i>rotation per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR-Spektroskopie)
<i>tert</i>	tertiär
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl-
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett
δ /ppm	chemische Verschiebung in ppm der Resonanzfrequenz der Referenzverbindung
λ	Wellenlänge
ν (cm ⁻¹)	Wellenzahl

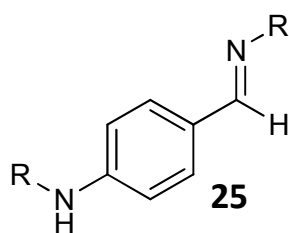
Strukturformelverzeichnis

Benzaldehyde 16



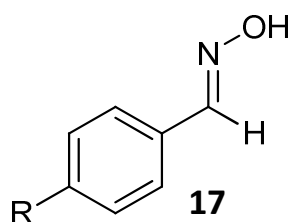
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Aminobenzaldehyd	<i>p</i> -NH ₂ BAlD, 16a
-NH(CH ₃)	<i>p</i> -Methylaminobenzaldehyd	16i
-NH(C ₂ H ₅)	<i>p</i> -Ethylaminobenzaldehyd	16k
-N(CH ₃) ₂	<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd	16l
-OH	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	<i>p</i> -OH-BAlD, 16b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxybenzaldehyd	<i>p</i> -OMe-BAlD, 16c
-CH ₃	<i>p</i> -Methylbenzaldehyd	<i>p</i> -Me-BAlD, 16d
-H	Benzaldehyd	BAlD, 16e
-Br	<i>p</i> -Brombenzaldehyd	<i>p</i> -Br-BAlD, 16f
-CN	<i>p</i> -Cyanobenzaldehyd	<i>p</i> -CN-BAlD, 16g
-NO ₂	<i>p</i> -Nitrobenzaldehyd	<i>p</i> -NO ₂ -BAlD, 16h

Benzimine 25



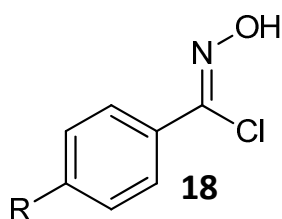
R =	Verbindung	Abkürzung
-CH ₃	<i>p</i> -Methylaminobenzmethylimin	25i
-C ₂ H ₅	<i>p</i> -Ethylaminobenzethylimin	25k

Benzaldoxime 17



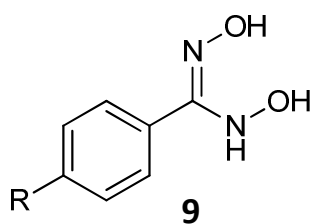
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Aminobenzaldoxim	<i>p</i> -NH ₂ BOx, 17a
-NH(CH ₃)	<i>p</i> -Methylaminobenzaldoxim	17i
-NH(C ₂ H ₅)	<i>p</i> -Ethylaminobenzaldoxim	17k
-N(CH ₃) ₂	<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldoxim	17l
-OH	<i>p</i> -Hydroxybenzaldoxim	<i>p</i> -OH-BOx, 17b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxybenzaldoxim	<i>p</i> -OMe-BOx, 17c
-CH ₃	<i>p</i> -Methylbenzaldoxim	<i>p</i> -Me-BOx, 17d
-H	Benzaldoxim	BOx, 17e
-Br	<i>p</i> -Brombenzaldoxim	<i>p</i> -Br-BOx, 17f
-CN	<i>p</i> -Cyanobenzaldoxim	<i>p</i> -CN-BOx, 17g
-NO ₂	<i>p</i> -Nitrobenzaldoxim	<i>p</i> -NO ₂ BOx, 17h

Benzhydroxamsäurechloride 18



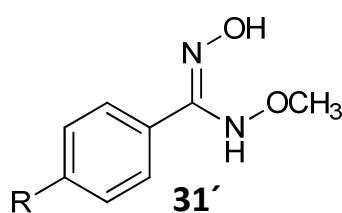
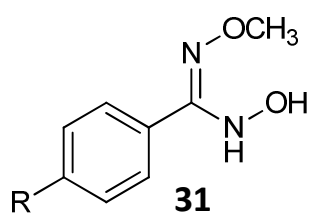
R =	Verbindung	Abkürzung
-OH	<i>p</i> -Hydroxybenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -OH-BOxCl, 18b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxybenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -OMe-BOxCl, 18c
-CH ₃	<i>p</i> -Methylbenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -Me-BOxCl, 18d
-H	Benzhydroxamsäurechlorid	BOxCl, 18e
-Br	<i>p</i> -Brombenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -Br-BOxCl, 18f
-CN	<i>p</i> -Cyanobenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -CN-BOxCl, 18g
-NO ₂	<i>p</i> -Nitrobenzhydroxamsäurechlorid	<i>p</i> -NO ₂ BOxCl, 18h

Dihydroxybenzamidine 9



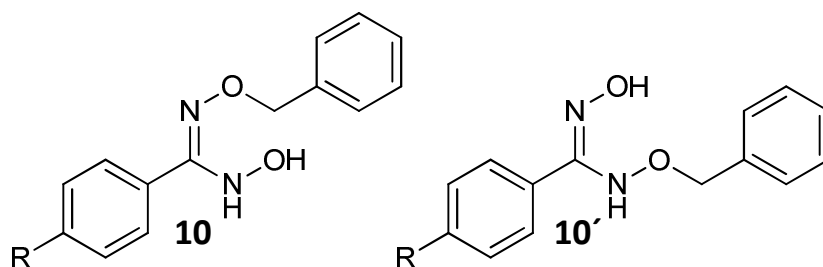
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Amino- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NH ₂ BDHA, 9a
-OH	<i>p</i> -Hydroxy- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OH-BDHA, 9b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHA, 9c
-CH ₃	<i>p</i> -Methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHA, 9d
-H	<i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin	BDHA, 9e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHA, 9f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHA, 9g

O-Methyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 31/31'



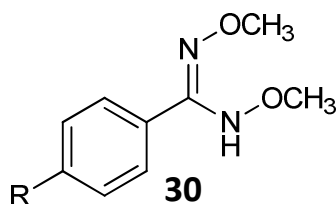
R =	Verbindung	Abkürzung
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>O</i> -methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHAOMe, 31/31'c
-CH ₃	<i>p</i> -Methyl- <i>O</i> -methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHAOMe, 31/31'd
-H	<i>O</i> -Methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHAOMe, 31/31'e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>O</i> -methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHAOMe, 31/31'f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>O</i> -methyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHAOMe, 31/31'g

***O*-Benzyl-*N,N'*-Dihydroxybenzamidine 10/10'**



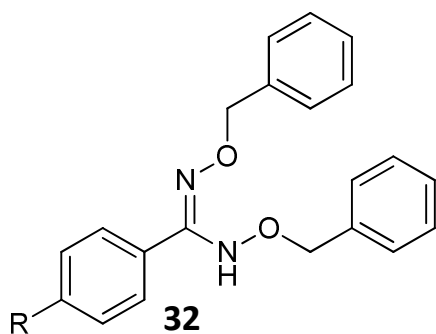
R =	Verbindung	Abkürzung
-OH	<i>p</i> -Hydroxy- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OH-BDHAOBn, 10/10' b
-OCH₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHAOBn, 10/10' c
-CH₃	<i>p</i> -Methyl- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHAOBn, 10/10' d
-H	<i>O</i> -Benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHAOBn, 10/10' e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHAOBn, 10/10' f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHAOBn, 10/10' g
-NO₂	<i>p</i> -Nitro- <i>O</i> -benzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NO ₂ BDHAOBn, 10/10' h

***O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 30**



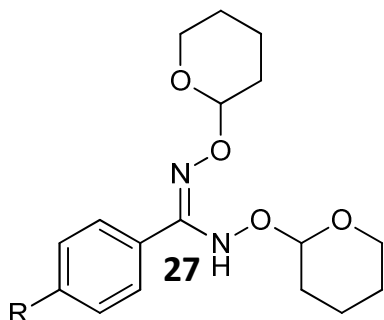
R =	Verbindung	Abkürzung
-OCH₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>O,O'</i> -dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHA2OMe, 30c
-CH₃	<i>p</i> -Methyl- <i>O,O'</i> -dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHA2OMe, 30d
-H	<i>O,O'</i> -Dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHA2OMe, 30e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>O,O'</i> -dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHA2OMe, 30f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>O,O'</i> -dimethyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHA2OMe, 30g

O,O'-Dibenzyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 32



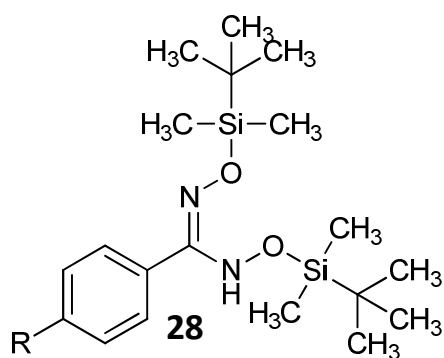
R =	Verbindung	Abkürzung
-OH	<i>p</i> -Hydroxy- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OH-BDHA2OBn, 32b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHA2OBn, 32c
-CH ₃	<i>p</i> -Methyl- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHA2OBn, 32d
-H	<i>O,O'</i> -Dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHA2OBn, 32e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHA2OBn, 32f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHA2OBn, 32g
-NO ₂	<i>p</i> -Nitro- <i>O,O'</i> -dibenzyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NO ₂ BDHA2OBn, 32h

O,O'-Ditetrahydropyranyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 27



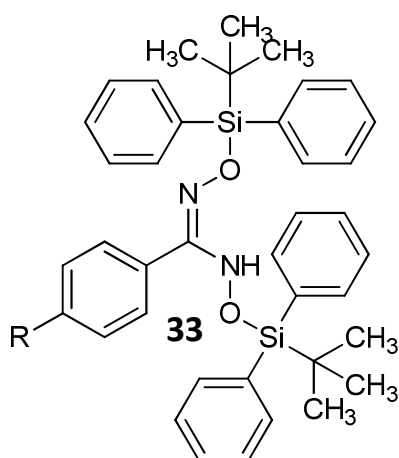
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Amino- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NH ₂ BDHA2OTHP, 27a
-OH	<i>p</i> -Hydroxy- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OH-BDHA2OTHP, 27b
-OCH ₃	<i>p</i> -Methoxy- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OMe-BDHA2OTHP, 27c
-CH ₃	<i>p</i> -Methyl- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Me-BDHA2OTHP, 27d
-H	<i>O,O'</i> -Ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHA2OTHP, 27e
-Br	<i>p</i> -Brom- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -Br-BDHA2OTHP, 27f
-CN	<i>p</i> -Cyano- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -CN-BDHA2OTHP, 27g
-NO ₂	<i>p</i> -Nitro- <i>O,O'</i> -ditetrahydropyranyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NO ₂ BDHA2OTHP, 27h

***O,O'*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 28**



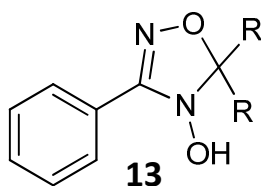
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Amino- <i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NH ₂ BDHA2OTBDMS, 28a
-OH	<i>p</i> -Hydroxy- <i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -OH-BDHA2OTBDMS, 28b
-H	<i>O,O'</i> -Di- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	BDHA2OTBDMS, 28e
-NO ₂	<i>p</i> -Nitro- <i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NO ₂ BDHA2OTBDMS, 28h

***O,O'*-Di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine 33**



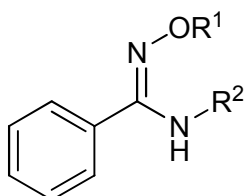
R =	Verbindung	Abkürzung
-NH ₂	<i>p</i> -Amino- <i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NH ₂ BDHA2OTBDPS, 33a
-NO ₂	<i>p</i> -Nitro- <i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl- <i>N,N'</i> -dihydroxybenzamidin	<i>p</i> -NO ₂ BDHA2OTBDPS, 33h

cyclische *N,N'*-Dihydroxybenzamidine 13



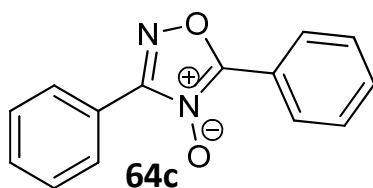
R =	Verbindung	Abkürzung
-CH ₃	4-Hydroxy-5,5-dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol	BDHAAce, 13d
-(CH ₂) ₄ -	4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.4]non-2-en	BDHACypent, 13i
-(CH ₂) ₅ -	4-Hydroxy-3-phenyl-1,2,4-oxadiazaspiro[4.5]dec-2-en	BDHACyhex, 13k

O-substituierte Benzamidoxime



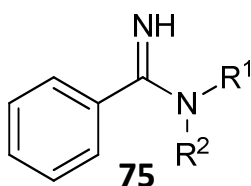
R¹ =	R² =	Verbindung	Abkürzung
-CH ₃	-H	O-Methylbenzamidoxim	BAOMe, 72
-Bn	-H	O-Benzylbenzamidoxim	BAOBn, 34
		5,5-Dimethyl-3-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol	BAOAce, 73

3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazol-4-oxid 64c



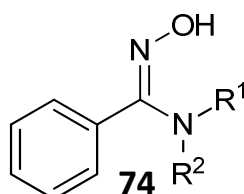
Verbindung	Abkürzung
3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazol-4-oxid	Dimer, 64c

N-substituierte Benzamidine



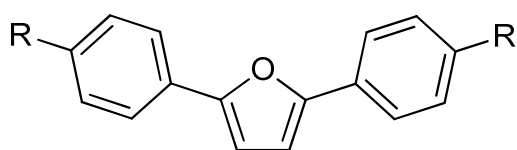
R ¹ =	R ² =	Verbindung	Abkürzung
-H	-H	Benzamidin	BA, 15
-H	-CH ₃	<i>N</i> -Methylbenzamidin	BANMe, 75a
-H	-Ph	<i>N</i> -Phenylbenzamidin	BAPh, 75b
-CH ₃	-CH ₃	<i>N,N</i> -Dimethylbenzamidin	BA2NMe, 75c
	-(CH ₂) ₅ -	1-(Benzimidoyl)-piperidin	BAPip, 75d
-CH ₃	-Ph	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -phenylbenzamidin	BAPhMe, 75e

N-substituierte Benzamidoxime



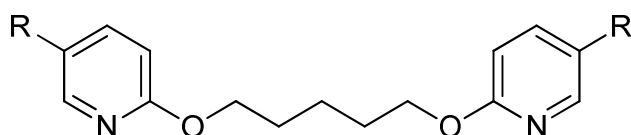
R ¹ =	R ² =	Verbindung	Abkürzung
-H	-H	Benzamidoxim	BAO, 14
-H	-CH ₃	<i>N</i> -Methylbenzamidoxim	BAONMe, 74a
-H	-Ph	<i>N</i> -Phenylbenzamidoxim	BAOPh, 74b
-CH ₃	-CH ₃	<i>N,N</i> -Dimethylbenzamidoxim	BAO2NMe, 74c
	-(CH ₂) ₅ -	2-(1-Piperidyl)benzaloxim	BAOPip, 74d
-CH ₃	-Ph	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -phenylbenzamidoxim	BAOPhMe, 74e

Furamide



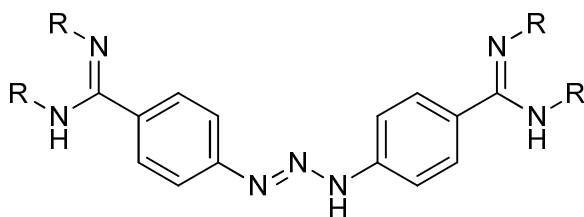
R =	Verbindung	Abkürzung
-H	2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan	Furamidin
-CHO	2,5-Bis(4-formylphenyl)furan	FuraDiBAld, 77
-CN	2,5-Bis(4-cyanophenyl)furan	FuraDiBCN
-CH(=NOH)	2,5-Bis(4-hydroxyaminophenyl)furan	FuraDiBOx, 78
	2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxim	FuraDiBAOMe, Pafuramidin, 7

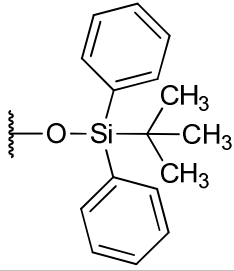
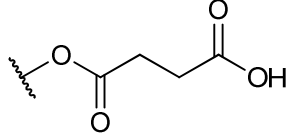
Heterocyclische Pentamidinanaloga



R =	Verbindung	Abkürzung
	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-amidinopyridin	wirksames Diamidin
-CN	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-cyanopyridin	PentyPyCN, Dinitril, 82
	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-N-hydroxyamidinopyridin	PentyPyAO, 83
	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-N-(3-carboxypropionyloxy)amidinopyridin	PentaPySucc, Bissuccinyl-Prodrug, 84
-CHO	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-formylpyridin	PentaPyAld, 86
	2,2'-Pentamethylenedioxy-bis-5,5'-N,N'-dihydroxyamidinopyridin	PentyPyDHA, 87

Diminazene



R =	Verbindung	Abkürzung
-H	1,3-Bis(4,4'-amidinophenyl)triazene	Diminazene
	1,3-Bis(4,4'-(<i>O,O'</i> -di- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl)- <i>N,N'</i> -dihydroxyamidino)phenyl)triazene	DimiTB DPS, 94
-OH	1,3-Bis(4,4'-(<i>N,N'</i> -dihydroxyamidino)phenyl)triazene	DimiBDHA, Tetrahydroxy-Diminazene, 92
 H,	1,3-Bis(4,4'-(<i>N</i> -(3-carboxypropionyloxy)-amidino)phenyl)triazene	Bissuccinyl-Diminazene

Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Januar 2015

Laura Schwarz

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Laura Schwarz
Geburtsdatum	26.01.1986
Geburtsort	Grevesmühlen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulische Ausbildung

1994 – 1998	Grundschule „Am Ploggensee“, Grevesmühlen
1998 – 2005	Gymnasium „Am Tannenberg“, Grevesmühlen
06/2005	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2005 – 10/2009	Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
12/2009 – 05/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Pharmazeutischen Institut der CAU zu Kiel mit Anfertigung einer Diplomarbeit
07/2010	Diplomierung
06/2010 – 11/2010	Praktisches Jahr in der Lornsen-Apotheke in Kiel
12/2010	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Promotion und Weiterbildung

Seit 04/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Pharmazeutischen Institut der CAU zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
vorauss. 03/2015	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Kurzfassung

Die Amidinfunktion ist Bestandteil zahlreicher Arzneistoffmoleküle mit unter anderem antikoagulatorischer und antiparasitärer Wirkung. Aufgrund ihres basischen Charakters liegen diese unter physiologischen Bedingungen geladen vor und können nach oraler Gabe durch passive Diffusion nicht aufgenommen werden. Üblich ist die parenterale Applikation. Hingegen stellt die Amidgruppe einen für die Wirkung essenziellen Molekülbestandteil dar, da sie durch Bioisosterie die Aminosäure Arginin imitiert und entsprechende ionische Wechselwirkungen mit Zielproteinen eingehen kann. Um die Vorteile der guten Wirksamkeit und der oralen Applizierbarkeit zu vereinen, ist die Überführung in Prodrugs sinnvoll.

Die Lipophilie der Amidine kann durch die Darstellung entsprechender Carbamat-, Acylamidin- und Amidoxim-Prodrugs effektiv erhöht werden. Durch die Substitution beider Stickstoffatome mit Hydroxylgruppen wird die Basizität der Verbindungen weiter herabgesetzt und die präsystemische Reduktion von nicht absorbierbaren Amidinen verringert. Die Synthese dieser Dihydroxyamidine stellte sich in der Vergangenheit allerdings als anspruchsvoll heraus.

Aus diesem Hintergrund wurde eine allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung von *N,N'*-Dihydroxybenzamidinen entwickelt und ihre Übertragbarkeit mittels unterschiedlicher *para*-Substituenten am Aromaten demonstriert. Die Grenze der Anwendbarkeit wurde bei *para*-aminosubstituierten Aromaten erreicht. Für diese Verbindungen wurde ein geeignetes Schutzgruppenkonzept entwickelt, welches die selektive Reduktion einer Nitrogruppe neben der geschützten Dihydroxyamidin-Funktion ermöglichte.

Alle neu synthetisierten Verbindungen wurden vollständig NMR-spektroskopisch untersucht. Die Korrelationsversuche der chemischen Verschiebungen der verschiedenen Atomkerne der funktionellen Gruppe mit den Hammett-Konstanten σ der *para*-Substituenten ergaben signifikante Zusammenhänge besonders der Atome der Oxim-Seitenkette des Dihydroxyamidins. Die gewonnenen Erkenntnisse können Vorhersagen zu Enzym-Substrat-Wechselwirkungen ermöglichen.

Durch *O*-Substitution der Dihydroxybenzamidine konnte die Stabilität der Verbindungen beträchtlich gesteigert werden. Die erfolgreiche enzymatische Aktivierung der Modellverbindung *O,O'*-Dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidin wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen und untersucht: Zunächst findet eine CYP450-abhängige geschwindigkeitsbestimmende Demethylierung statt und anschließend folgt die schnelle und effektive mARC-abhängige Reduktion zur Modell-Wirkform Benzamidin.

Weiterhin wurde die mARC-abhängige Metabolisierung verschiedener stickstoffs substituierter Benzamidoxime in Inkubationsstudien mit Enzymfraktionen sowie mit den rekonstituierten rekombinanten Enzymsystemen rhmARC1 und rhmARC2 untersucht. Demnach bewirken elektronenschiebende Substituenten eine verstärkte Reduktion durch mARC. Allerdings wirkt sich die zweifache Substitution des Amin-Stickstoffs – auch bei +I- und +M-Eigenschaften der Reste – durch eine sterische Hinderung negativ auf die Umsetzung aus. Ein besonders desaktivierender Effekt wurde durch Phenylsubstitution beobachtet.

Abstract

The amidine functional group is part of many active agents including anticoagulants and antiparasitics. Amidines possess a positive charge under physiological conditions due to their basic character which results in a lack of absorption by diffusion after oral application. Therefore, parenteral application of amidine containing drugs is required. The amidine functional group is essential for the desired effect of the active agent since it acts bioisostere to the amino acid arginine with the appropriate strong ionic interactions with target proteins. The transformation into a prodrug leads to a combination of the advantages of high efficacy and oral dosage form.

The formation of carbamate-, acylamidine- or amidoxime prodrugs effectively raises the lipophilicity of amidines. With the substitution of both nitrogen atoms with hydroxyl groups the basic character of the amidine prodrug further decreases, which, in turn, diminishes the presystemic reduction to non-absorbable amidines. However, in the past the synthesis of dihydroxyamidines turned out to be challenging.

Therefore a general method for the synthesis of *N,N'*-dihydroxybenzamidines was acquired. The adaptability of the strategy was demonstrated by the use of different *para*-substituted aromatic compounds. As an exception, the transfer of the general synthetic methodology on *para*-amino substituted derivatives was not accomplished. For these agents, an alternative synthesis strategy with the use of protecting groups allowing the selective reduction of nitro to amino groups in the presence of the dihydroxyamidine function was developed.

All newly synthesized compounds were fully characterized by NMR spectroscopy. The correlation attempts of the Hammett σ constants of the substituents in *para*-position of the aromatic system with the NMR chemical shifts of the functional group nuclei resulted in significant relationships especially with the atoms of the oxime side chain of the dihydroxyamidine function. The obtained knowledge allows forecasts for substrate enzyme interactions.

By the substitution of the dihydroxyamidine oxygen atoms, the compound stability could be enhanced significantly. The successful enzymatic activation of the model substrate *O,O'*-dimethyl-*N,N'*-dihydroxybenzamidine was investigated and verified *in vitro* and *in vivo*: In a first step, the velocity determining cytochrome P450 dependent demethylation occurs which is followed by the fast and effective reduction to the model agent benzamidine through the mARC containing enzyme system.

Furthermore, the mARC dependent metabolism of different amino nitrogen substituted benzamidoximes was investigated by incubation studies with enzyme fractions and reconstituted recombinant enzyme systems with rhmARC1 and rhmARC2. According to that, electron donating substituents effect an increase of the mARC reduction rate. However, the twofold substitution of the amine nitrogen results in a lowered metabolism through mARC due to the steric hindrance even if both substituents possess +I and +M characteristics and pull electrons into the system. Phenyl substitution turned out to be notably deactivating for the mentioned reduction.